

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN
**SCIENZE FARMACOLOGICHE E TOSSICOLOGICHE,
DELLO SVILUPPO E DEL MOVIMENTO UMANO**

Ciclo XXX

Settore Concorsuale: 05/F1

Settore Scientifico Disciplinare: BIO/13

**IDENTIFICAZIONE E VALIDAZIONE DI BIOMARCATORI
MOLECOLARI NEL SARCOMA DI EWING**

Presentata da: Cristina Baricordi

Coordinatore Dottorato

Chiar.ma Prof.ssa

PATRIZIA HRELIA

Supervisore

Chiar.ma Prof.ssa

CINZIA ZUCCHINI

Supervisore

Chiar.ma Prof.ssa

KATIA SCOTLANDI

Esame finale anno 2018

INDICE

ABSTRACT	6
SOMMARIO	7
INTRODUZIONE.....	9
1. Il sarcoma di Ewing	9
1.1 Morfologia, istologia e caratteristiche citogenetico-molecolari.....	9
1.2 Patogenesi molecolare.....	12
1.3 Panorama genomico	13
1.4 Trascrittoma non codificante: microRNA, lncRNA	14
1.5 Trattamento	17
1.6 Fattori prognostici	18
2. Biomarcatori tumorali.....	19
2.1 Generalità e definizioni	19
2.2 Biopsia liquida	22
3. Biomarcatori molecolari nel sarcoma di Ewing.....	23
3.1 Biomarcatori validati in studi prospettici.....	24
3.2 Biomarcatori in corso di validazione prospettica.....	24
3.3 Biomarcatori validati in studi retrospettivi	25
SCOPO DELLA TESI.....	27
MATERIALI E METODI.....	29
Selezione dei pazienti	29
Isolamento del plasma.....	30
Estrazione RNA	30
Realtime PCR.....	31
RNA sequencing	32
Studio mutazioni TP53	32
Ottenimento di cloni cellulari over-esprimenti miR-34a	33
Caratterizzazione in vitro di cloni over-esprimenti miR-34a	34

Caratterizzazione in vivo di cloni over-esprimenti miR-34a.....	34
RISULTATI	35
1. Validazione del valore prognostico di LGALS3BP e miR-34a in una casistica di sarcoma di Ewing localizzato.....	35
1.1 I livelli di espressione di LGALS3BP predicono l'esito clinico in analisi univariata	37
1.2 I livelli di espressione di miR-34a predicono l'esito clinico in analisi univariata	39
1.3 LGALS3BP e miR-34a sono predittori indipendenti dell'esito clinico in analisi multivariata	41
2. Ruolo di miR-34a nel sarcoma di Ewing	42
2.1 miR-34a ha come bersaglio l'isoforma 1B della ciclina D1	42
2.2 Un modello cellulare di over-espressione stabile conferma il ruolo oncosoppressore di miR-34a nel sarcoma di Ewing in vitro ed in vivo	44
3. Studio esplorativo del valore predittivo dei livelli di miR-34a circolante.....	49
4. Identificazione di potenziali nuovi biomarker associati alla risposta alla chemioterapia.....	52
4.1 I trascritti EWSR1-ETS sono gli unici trascritti di fusione ricorrenti nel nostro gruppo di pazienti	54
4.2 Mutazioni a carico di TP53 si presentano con frequenza differenziale in pazienti con buona o scarsa risposta alla chemioterapia.	56
4.3 Pazienti con diverso grado di risposta alla chemioterapia presentano livelli differenziali di espressione di lncRNAs	64
DISCUSSIONE	65
CONCLUSIONI.....	71
BIBLIOGRAFIA	72
RINGRAZIAMENTI.....	81

ABSTRACT

Ewing sarcoma, the second most common primary bone malignancy (after osteosarcoma), is a highly aggressive mesenchymal tumor arising mainly in adolescents and young adults. Current multimodal treatment, which combines systemic chemotherapy and local control, has reached a plateau in which 5-year overall survival (5y OVS) is 70% for patients with localized disease, 30% for patients with metastases at diagnosis, and 25% for patients with recurrent disease. Moreover, even when treatment is successful in terms of disease control, patients suffer from acute and long term toxicity related to chemotherapy. For this reason, and considering the young age of these patients, it is paramount the development of molecular biomarkers allowing stratification of patients based on risk at diagnosis. The present study validates LGALS3BP and miR-34a as independent predictors of clinical outcome in 124 Ewing sarcoma patients treated in a single Institution. Patients with high expression levels of these molecules have lower risk of developing local recurrences or metastasis (HR 0.402, 95% CI 0.190-0.850 for LGALS3BP; HR 0.485, 95% CI 0.236 - 0.996 for miR-34a), and a lower risk of disease-related death (HR 0.397, 95% CI 0.159-0.993 for LGALS3BP; HR 0.353, 95% CI 0.132-0.943 for miR-34a). By developing and characterizing *in vitro* and *in vivo* a cell model of stable miR34a expression, we confirmed its oncosuppressor role in Ewing sarcoma; one of the underlying mechanisms of action involve the inhibition of the 1B isoform of cyclin D1, a direct target of EWS-FLI1, the aberrant transcription factor characteristic of the disease. We also show the feasibility of non-invasive circulating miR-34a quantification. Through a whole transcriptome sequencing approach applied to pre-treatment biopsies from patients with differential chemotherapy response, we identified 4 mutations in the TP53 gene (p.R213X, p.R248W, p.R273C and p.K386M *de novo* mutation) defining a patient group with poor response to treatment, and a panel of lincRNA with differential expression in the two groups. Overall these results contribute to the definition of a spectrum of molecular features of Ewing sarcoma impacting clinical outcome, which are promising candidates for prospective validation.

SOMMARIO

Il sarcoma di Ewing, il secondo più diffuso tumore primitivo dell'osso (dopo l'osteosarcoma), è un tumore di origine mesenchimale estremamente aggressivo e con tendenza a dare metastasi, che colpisce prevalentemente adolescenti e giovani adulti. L'attuale approccio terapeutico multimodale, che combina chemioterapia sistemica e controllo locale, ha raggiunto un plateau di efficacia in cui la sopravvivenza a 5 anni (5y OVS) è del 70% per pazienti con malattia localizzata, 30% per pazienti metastatici alla diagnosi, e 25% per pazienti recidivanti. Inoltre, anche laddove la terapia si dimostri efficace nel controllo della malattia, i pazienti soffrono di sostanziali effetti di tossicità acuta o a lungo termine legata alla chemioterapia. Per questo motivo, e anche considerata la giovane età dei pazienti, è di fondamentale importanza lo sviluppo di biomarcatori molecolari che permettano un'opportuna stratificazione dei pazienti in base al rischio alla diagnosi. Questo studio conferma LGALS3BP e miR-34a come predittori indipendenti dell'esito clinico in una casistica di 124 pazienti affetti da sarcoma di Ewing localizzato alla diagnosi, trattati presso un singolo Istituto. Pazienti con elevati livelli di espressione di queste molecole hanno un rischio ridotto di sviluppare recidive locali o metastasi (HR 0.402, 95% CI 0.190-0.850 per LGALS3BP; HR 0.485, 95% CI 0.236 - 0.996 per miR-34a), ed un rischio ridotto di decesso legato al tumore (HR 0.397, 95% CI 0.159-0.993 per LGALS3BP; HR 0.353, 95% CI 0.132-0.943 per miR-34a). Tramite lo sviluppo e la caratterizzazione *in vitro* ed *in vivo* di un modello di over-espressione stabile di miR-34a, abbiamo confermato il ruolo oncosoppressore di questo miRNA nel sarcoma di Ewing; uno dei meccanismi d'azione sembra essere l'inibizione dell'isoforma 1B della ciclina D1, target diretto di EWS-FLI1, fattore trascrizionale aberrante caratteristico di questo tumore. È stata inoltre provata la fattibilità della quantificazione di miR-34a circolante in maniera non invasiva per il paziente. Tramite un approccio di whole transcriptome sequencing su biopsie pre-trattamento ottenute da pazienti selezionati in base alla differenziale risposta alla chemioterapia, sono state identificate 4 mutazioni a carico di TP53 (p.R213X, p.R248W, p.R273C e p.K386M mutazione *de novo*), che definiscono una classe di pazienti con scarsa risposta al trattamento, ed un pannello di lincRNAs con espressione differenziale nei due gruppi. Nell'insieme questi risultati concorrono alla definizione di uno spettro di caratteristiche molecolari del sarcoma di Ewing in grado di influenzare l'esito clinico dei pazienti, e che riteniamo possano essere promettenti candidati per la validazione in studi prospettici.

INTRODUZIONE

1. Il sarcoma di Ewing

I tumori primitivi dell'osso rappresentano il 5% dei tumori pediatrici e dell'età adolescenziale, ed il sarcoma di Ewing (ES) è il secondo più diffuso tumore primitivo dell'osso, dopo l'osteosarcoma. Si tratta di una malattia rara (l'incidenza è di 1-3 nuovi casi per milione per anno nell'emisfero occidentale), che colpisce prevalentemente adolescenti e giovani adulti (il picco di incidenza è intorno ai 15 anni di età); si presenta più comunemente nella popolazione bianca e con un rapporto maschi:femmine pari a 1.5:1. Può svilupparsi in qualsiasi sito dell'organismo, ma l'osso è la sede primaria più comune, specialmente pelvi, diafisi delle ossa lunghe, e ossa della gabbia toracica; circa il 15% dei pazienti mostra localizzazione extra-scheletrica (Riggi and Stamenkovic, 2007).

Il sarcoma di Ewing ha un decorso estremamente aggressivo, con tendenza a dare ricorrenze locali e metastasi. Il 20-25% dei pazienti presenta metastasi alla diagnosi, e alla luce del basso tasso di successo di approcci terapeutici basati sul solo controllo locale (sopravvivenza <20%), si ritiene che una sostanziale frazione di pazienti presenti micro-metastasi non rilevabili alla diagnosi. Lo schema di trattamento attuale, basato su controllo locale tramite chirurgia e/o radioterapia combinato a controllo sistemico tramite chemioterapia, ha permesso di raggiungere una sopravvivenza a 5 anni (5y OVS) intorno al 70% nei pazienti con malattia localizzata, mentre la prognosi rimane infausta per pazienti metastatici alla diagnosi (5y OVS <30%) (Gaspar et al., 2015).

1.1 Morfologia, istologia e caratteristiche citogenetico-molecolari

Il sarcoma di Ewing appartiene, insieme ai PNET (primitive neuroectodermal tumors) e ai tumori di Askin, alla famiglia dei tumori di Ewing (ESFT), un gruppo di neoplasie con un vario grado di differenziamento neurale ed una serie di caratteristiche istologiche in comune. Dal punto di vista morfologico, il sarcoma di Ewing convenzionale ha un aspetto a foglietti impaccati di cellule con piccoli nuclei tondeggianti od ovali con pattern monomorfo, cromatina finemente granulare e nucleoli incospicui. Il citoplasma presenta spesso estesi depositi di glicogeno evidenziabili con colorazione PAS. Aree emorragiche e di necrosi sono frequenti (de Alava, 2017). Viene descritta anche una variante a grandi cellule (o sarcoma di Ewing atipico), con nuclei di maggiori dimensioni e contorni più irregolari, citoplasmici frequentemente PAS negativi; le caratteristiche immunofenotipiche e molecolari sono simili a quelle dell'istotipo convenzionale. Istotipi con segni più marcati di differenziamento neurale (PNET) mostrano frequentemente strutture note come rosette di Homer-

Wright (gruppi di cellule orientate intorno ad un centro neurofibrillare avascolare, costituito da processi citoplasmatici), ed espressione di marker neurali o neuroectodermici (enolasi neurone-specifica, Leu-7 o CD57). L'istotipo non ha influenze significative sulla prognosi dei pazienti (de Alava, 2017).

La diagnosi di sarcoma di Ewing, un tempo effettuata per esclusione, è oggi facilitata dall'utilizzo combinato di marcatori immunofenotipici per la diagnosi istologica, che viene successivamente confermata con indagini citogenetiche e molecolari. Le caratteristiche immunoistochimiche del sarcoma di Ewing sono la positività per gli antigeni CD99, FL1, e Caveolina1 (CAV1), e negatività per un pannello di altri antigeni inclusi marcatori muscolari e linfoidi (Gamberi et al., 2011; Llombart-Bosch et al., 2009).

CD99 è una proteina di membrana espressa in circa il 95% dei sarcomi di Ewing, prodotto del gene MIC2 presente nella regione pseudoautosomica dei cromosomi X e Y; è coinvolto in un'ampia serie di processi biologici quali adesione e migrazione cellulare, apoptosi, differenziamento dei linfociti T, diapedesi, mantenimento della morfologia cellulare, regolazione del traffico intracellulare delle proteine di membrana (Pinto et al., 2011). Nel sarcoma di Ewing svolge un ruolo chiave nel prevenire il differenziamento neurale, nel favorire la proliferazione, migrazione e capacità di dare metastasi (Rocchi et al., 2010). CD99 è un marcatore con elevata sensibilità ma non è specifico per il sarcoma di Ewing, essendo espresso anche in una varietà di tessuti normali ed altri tumori a piccole cellule tondeggianti (de Alava, 2017).

FLI1 è un membro della famiglia dei fattori di trascrizione ETS normalmente espresso in cellule endoteliali ed emopoietiche e coinvolto nella proliferazione cellulare e tumorigenesi. È un marcatore più specifico rispetto a CD99, anche se presenta una minore sensibilità (espresso in circa il 70% dei sarcomi di Ewing) (de Alava, 2017).

CAV1 è una proteina coinvolta nella formazione delle caveole, invaginazioni della membrana plasmatica che regolano diverse pathway di segnalazione cellulare; è espressa in più del 90% dei casi Ewing (Llombart-Bosch et al., 2009), ed ha un ruolo nel favorire il fenotipo oncogenico e la tumorigenicità di questi tumori (Tirado et al., 2006).

Dal punto di vista citogenetico-molecolare, il sarcoma di Ewing è definito dalla presenza di traslocazioni cromosomiche bilanciate tumore-specifiche che determinano la produzione di geni di fusione implicati nell'oncogenesi. Nella quasi totalità dei casi, queste traslocazioni coinvolgono il gene EWS (localizzato sul cromosoma 22), appartenente alla famiglia delle proteine TET (insieme a

TLS/FUS e TAF15), ed un membro della famiglia dei fattori di trascrizione ETS: FLI1 (localizzato sul cromosoma 11) in più dell'85% dei casi; ERG (sul cromosoma 21) nel 5-10% dei casi; ETV1, ETV4 o FEV (localizzati rispettivamente sui cromosomi 7, 17 e 2) in meno dell'1% dei casi (Pinto et al., 2011).

La traslocazione meglio caratterizzata è $t(11;22)(q24;q12)$, che risulta nel prodotto di fusione EWS-FLI1. I siti cromosomici di rottura coinvolti sono molteplici e si trovano in regioni introniche (4 possibili introni per EWS, 6 possibili introni per FLI1); questo risulta in un'elevata eterogeneità dei trascritti di fusione, che vengono denominati 'tipo 1, 2, 3 ...' sulla base della combinazione di esoni provenienti da EWS e FLI1 mantenuta nel trascritto maturo (Gamberi et al., 2011; Sankar and Lessnick, 2011; Zucman et al., 1993). Uno studio del 2011 effettuato presso l'Istituto Ortopedico Rizzoli ha valutato le frequenze dei diversi sottotipi di trascritti, mostrando che EWS-FLI1 di tipo 1 è il più frequente (esoni 7/6; frequenza 67.8%), seguito da EWS-FLI1 di tipo 2 (esoni 7/5, 25.9%), tipo 4 (esoni 10/5, 2.7%) e tipo 3 (esoni 10/6, 1.8%) (Gamberi et al., 2011). Per lungo tempo si è ritenuto che diversi sottotipi di EWS-FLI1 definissero diversi gruppi di rischio nel sarcoma di Ewing, in particolare pazienti con EWS-FLI1 di tipo 1 sembravano avere migliore esito clinico (de Alava et al., 1998); studi prospettici più recenti non hanno invece evidenziato un'associazione tra sottotipo di fusione e sopravvivenza, mostrando come l'evoluzione e la maggiore efficacia degli attuali protocolli terapeutici abbia eliminato il vantaggio di sopravvivenza legato ad uno specifico prodotto di fusione (van Doorninck et al., 2010).

Oltre alle canoniche traslocazioni EWS-ETS, sono stati riportati casi ESFT in cui geni membri della famiglia TET diversi da EWS sono coinvolti in traslocazioni bilanciate con fattori di trascrizione ETS: è il caso delle traslocazioni $t(16;21)(p11;q22)$ FUS-ERG e $t(2;16)(q35;p11)$ FUS-FEV, rilevate in meno dell'1% dei casi. Trattandosi di traslocazioni molto rare le informazioni funzionali a riguardo sono limitate, e pur riconoscendo che il meccanismo d'azione delle proteine chimeriche risultanti può essere compreso solo con studi *ad hoc*, la visione attuale sostiene che queste traslocazioni, coinvolgendo membri delle famiglie TET ed ETS, producano proteine di fusione funzionalmente analoghe ad EWS-FLI1 (Sankar and Lessnick, 2011).

È infine importante menzionare che esiste un gruppo di tumori 'Ewing-like', attualmente diagnosticati su base istologica e trattati come sarcomi di Ewing, con traslocazioni che giustappongono EWS a fattori non-ETS (NFATc2, SMARCA5, PATZ1, SP3) (Mastrangelo et al., 2000; Sumegi et al., 2011; Szuhai et al., 2009; Wang et al., 2007; Yamaguchi et al., 2005), o che non comprendono né geni TET né ETS (CIC-DUX4, BCOR-CCNB3) (Cohen-Gogo et al., 2014; Specht et al., 2014). Studi sono in corso per definire se si tratti di varianti di sarcoma di Ewing o di entità

cliniche distinte.

1.2 Patogenesi molecolare

Il sarcoma di Ewing rappresenta il prototipo dei sarcomi con cariotipo semplice, caratterizzati da traslocazioni tumore-specifiche codificanti per proteine chimeriche la cui funzione aberrante è il principale motore della patogenesi (Helman and Meltzer, 2003). La traslocazione t(11;22)(q24;q12) risulta nella produzione della proteina chimerica EWS-FLI1, che ritiene nella porzione N-terminale domini di attivazione trascrizionale derivanti da EWS (nello specifico, ripetizioni di serina-tirosina-glicina-glutamina, presenti in numerosi altri fattori di trascrizione), e nella porzione C-terminale il dominio ETS di legame al DNA derivante da FLI1 (più specificamente un motivo 'winged helix-turn-elix' che riconosce sequenze di DNA contenenti motivi centrali GGAA/T). La capacità di trasformare cellule NIH3T3 prova che EWS-FLI1 è un potente oncogene (May et al., 1993a), la cui espressione è indispensabile per mantenere il fenotipo maligno nel sarcoma di Ewing (Chansky et al., 2004; Kovar et al., 1996; Ouchida et al., 1995). È oggi ben accettato che EWS-FLI1 agisce come un fattore di trascrizione aberrante, i cui geni target contribuiscono alla trasformazione oncogenica e al mantenimento del fenotipo tumorale (May et al., 1993b; Ohno et al., 1993). Geni up-regolati da EWS-FLI1 e critici per l'oncogenesi comprendono NR0B1, NKX2.2 e GLI1; inoltre esiste un ampio spettro di geni target implicati nel mantenimento del fenotipo quali CCND1, IGFBP3, GSTM4, p21, TGFBR2, hTERT, VEGF, CAV ed EZH2, che influenzano rispettivamente: evasione dell'apoptosi, farmaco-resistenza, controllo del ciclo cellulare, perdita dell'inibizione della crescita, immortalizzazione, angiogenesi, adesione e mantenimento della pluripotenza (Sankar and Lessnick, 2011).

Un aspetto di fondamentale importanza per comprendere la biologia del sarcoma di Ewing è la definizione della sua cellula d'origine. Trattandosi di tumori istologicamente poco differenziati e con caratteristiche sia mesenchimali che neuroectoderliche, la comunità scientifica si dibatte sull'origine neuroectodermica o mesenchimale di questi tumori. Cellule staminali mesenchimali (MSC) di derivazione ossea sono un candidato forte in questo riguardo per diversi motivi: sono le uniche cellule primarie umane permissive all'espressione stabile di EWS-FLI1 senza andare incontro a blocco della crescita o morte cellulare (Riggi et al., 2005); in questo contesto cellulare EWS-FLI1 agisce come fattore trascrizionale aberrante determinando trasformazione cellulare tramite deregolazione genica (Riggi et al., 2008); in MSC pediatriche EWS-FLI1 induce la trasformazione cellulare in assenza di altre mutazioni ed induce l'espressione di geni correlati alla staminalità (OCT4, SOX2, NANOG)

insieme a geni coinvolti nel differenziamento neurale e neuroectodermico (Riggi et al., 2010). L'importanza della cellula di origine si riflette anche nella difficoltà dell'ottenimento di un modello murino di sarcoma di Ewing. L'espressione di EWS-FLI1 nel topo è letale a livello embrionale; tentativi di espressione ristretta a progenitori del midollo osseo (modello *Mx1-cre*) hanno portato allo sviluppo di leucemie mieloidi o eritroidi, ma non sarcomi (Torchia et al., 2007); l'espressione ristretta al mesenchima primitivo dell'arto (modello *Prx1-cre*) origina sarcomi solo in concomitanza di mutazioni di TP53 (Lin et al., 2008). Nel complesso queste evidenze sottolineano l'importanza del contesto cellulare e il fatto che ulteriori mutazioni potrebbero cooperare con EWS-FLI1 nello sviluppo tumorale.

1.3 Panorama genomico

Gli ultimi anni hanno visto emergere i risultati di un'ampia serie di studi di next generation sequencing condotti su tumori primari e linee cellulari di sarcoma di Ewing a livello di genoma, trascrittoma ed epigenoma (Sand et al., 2015). Lo scopo primario di questi studi è stata l'identificazione di alterazioni ricorrenti e specifiche del sarcoma di Ewing che potessero fornire nuove informazioni sull'onset tumorale (in particolare eventi secondari cooperanti con EWS-FLI1 nella trasformazione cellulare), sulla risposta al trattamento (alterazioni che identificano tumori più resistenti o più sensibili alla chemioterapia), e sull'identificazione di possibili nuovi target terapeutici. Gli studi di Brohl, Crompton, Tirode e colleghi, hanno generato nel loro insieme dati di whole genome sequencing (WGS) ottenuti da 125 tumori primari, dati di whole exome sequencing (WES) ottenuti da 97 tumori primari e 11 linee cellulari, dati di targeted sequencing ottenuti da 251 tumori primari e 37 linee cellulari, e dati di whole transcriptome sequencing (RNAseq) ottenuti da 81 tumori primari e 41 linee cellulari (Brohl et al., 2014; Crompton et al., 2014; Tirode et al., 2014).

Un elemento chiave portato alla luce da questi studi, è la conferma che il sarcoma di Ewing è un tumore relativamente stabile dal punto di vista genetico, il cui tasso di mutazioni somatiche (0.65-0.15 mutazioni per Mb) è uno tra i più bassi se confrontato con altri tipi di tumore (Lawrence et al., 2013). Le variazioni di un singolo nucleotide (SNV) ricorrenti sono relativamente poche, e quelle più frequenti sono a carico dei geni STAG2 (9-21.5% dei pazienti) e TP53 (5.2-7%). STAG2, associato al sarcoma di Ewing per la prima volta in seguito a questi studi, codifica per una subunità del complesso delle coesine, coinvolto nella regolazione della separazione dei cromatidi fratelli durante la mitosi, nel rimodellamento della cromatina, nel riparo delle forcelle di replicazione e nelle double strand breaks. Lo status di STAG2 mutato si accompagna generalmente a perdita dell'espressione della proteina, ed è più frequente in pazienti metastatici alla diagnosi (Crompton et al., 2014); sembra

inoltre associato ad un aumento delle varianti strutturali e una riduzione della probabilità di sopravvivenza, associazione che però dipende fortemente dal concorrente status mutazionale di TP53. Mutazioni a carico di TP53 e STAG2 tendono a infatti a co-presentarsi nei tumori analizzati in questi studi, e sembrano avere un impatto sul decorso clinico della malattia, descrivendo un sottogruppo di pazienti con prognosi particolarmente sfavorevole; mutazioni a carico di TP53 sono invece associate ad un esito clinico sfavorevole indipendentemente dallo status di STAG2 (Tirode et al., 2014). Altre SNV ricorrenti portate alla luce dai 3 studi sono nel complesso poco frequenti e coinvolgono regolatori epigenetici (EZH2, 3/112 casi), (Tirode et al., 2014), fattori di trascrizione appartenenti alla famiglia ETS (ERF, 3/46 casi) (Crompton et al., 2014), pathway di riparo del DNA (polimorfismo K3326X in BRCA2, 4/55 casi) (Brohl et al., 2014).

La ricerca di varianti strutturali non ha evidenziato traslocazioni comuni che si presentassero insieme alle traslocazioni EWS-ETS; solo campioni EWS-ETS negativi hanno portato alla luce traslocazioni alternative (FUS-NCATc2 e CIC-FOXO4, non descritte precedentemente, ed ETV6-NTRK3 descritta in altri tumori), e clusterizzano separatamente dagli altri campioni inclusi nell'analisi sulla base del profilo trascrizionale, suggerendo si tratti di un'entità distinta rispetto al sarcoma di Ewing classico (Brohl et al., 2014). La ricerca di variazioni del copy number ha confermato il guadagno dei cromosomi 1q, 8, 12 e la perdita di 9p21 e 16q come le più frequenti nel sarcoma di Ewing.

Il sequenziamento del sarcoma di Ewing non ha dunque identificato alterazioni comuni (SNV, varianti strutturali o del copy number) eligibili ad eventi secondari cooperanti con le traslocazioni EWS-ETS nel favorire l'oncogenesi, suggerendo che altri meccanismi (ad esempio alterazioni epigenetiche) siano coinvolti nel creare un contesto cellulare permissivo. Le mutazioni identificate vengono verosimilmente acquisite durante la progressione tumorale, e poiché spesso associate all'esito clinico, forniscono un potenziale strumento per la definizione di nuovi gruppi di rischio o per il monitoraggio del decorso della malattia (Sand et al., 2015).

1.4 Trascrittoma non codificante: microRNA, lncRNA

I microRNA sono piccoli RNA (circa 22 nt) che agiscono come regolatori post-trascrizionali dell'espressione genica. Vengono trascritti nel nucleo dalla RNA polimerasi II in forma di precursori (pri-miRNA) di lunghezza variabile (fino a 3-4Kb); qui vengono processati dalla RNAsi III Drosha insieme al suo partner DGCR8 in pre-miRNA di 60-70 nt con struttura stem-loop. I pre-miRNA vengono esportati nel nucleo tramite Exportina 5 e Ran-GTP, dove l'RNAsi III Dicer taglia il loop

del pre-miRNA generando un duplex che contiene il filamento di miRNA maturo di 18-25 nt. Il miRNA maturo interagisce con la proteina AGO e viene incluso nel complesso ribonucleoproteico RISC (RNA-induced silencing complex) all'interno del quale avviene l'interazione con gli mRNA target. Il legame al target è mediato dall'interazione tra una sequenza di 2-8nt al 5' del miRNA chiamata 'seed region' e la regione 3' (o, talvolta, 5') non tradotta del target stesso. In base al grado di complementarità tra queste regioni, la regolazione dell'espressione genica può esplicarsi tramite degradazione del bersaglio (complementarità perfetta) o inibizione della traduzione (complementarità parziale). Si stima che un singolo miRNA possa avere più di 100 target, e che un singolo mRNA possa essere regolato da numerosi miRNA. Ad oggi sono annotati più di 2588 miRNA umani, che nel complesso possono regolare più del 30% del genoma (Armand-Labit and Pradines, 2017).

È ormai ben noto che i miRNA sono deregolati in diversi contesti patologici, incluso il cancro. Essendo la patogenesi del sarcoma di Ewing guidata principalmente dal fattore trascrizionale aberrante EWS-FLI1, numerosi sono gli studi che hanno descritto i cambiamenti nel profilo di espressione dei miRNA in seguito a silenziamento (transiente o stabile) di EWS-FLI1, o confrontato i profili di espressione dei miRNA in linee cellulari o tumori Ewing con quelli delle MSC, putative cellule d'origine di questo tumore. Sebbene i risultati mostrino una certa variabilità dovuta verosimilmente al diverso setting sperimentale o alla piattaforma di profiling utilizzata, questi studi hanno identificato gruppi di miRNA significativamente up- o down-regolati, confermando una disregolazione dell'espressione dei miRNA nel sarcoma di Ewing almeno in parte mediata da EWS-FLI1 (Dylla et al., 2013). Tra questi miRNA, quelli caratterizzati dal punto di vista funzionale includono: miR-31 (downregolato rispetto a MSC), se overespresso in linee Ewing determina riduzione dell'espansione tramite apoptosi o blocco del ciclo cellulare, e riduzione dell'invasività (Karnuth et al., 2014); miR-125b (downregolato rispetto a MSC) se riespresso determina riduzione di parametri di malignità in vitro quali proliferazione, migrazione e invasione, promuove inoltre il blocco del ciclo cellulare e l'apoptosi, apparentemente tramite inibizione del target PIK3CD, coinvolto nel signalling di PI3K (Li et al., 2014); miR30a-5p (downregolato da EWS-FLI1), se riespresso inibisce proliferazione ed invasione cellulare, ed è in grado di regolare l'espressione di CD99 (Franzetti et al., 2013); miR145 (downregolato da EWS-FLI1) è coinvolto in un feedback loop reciprocamente inibitorio con EWS-FLI1, la sua repressione è richiesta per lo sviluppo del fenotipo di cancer stem cell (CSC) a partire da MSC normali (Riggi et al., 2010); clusters miR-17~92a, miR-106b~25 e miR-106a~363 (upregolati), il loro silenziamento risulta nella riduzione della crescita clonogenica (Dylla and Jedlicka, 2013; Li et al., 2015). Uno studio di miRNA profiling effettuato su 49 casi Ewing selezionati in base al differente esito clinico ha identificato un pannello di 5 miRNA associati ad event-free ed overall survival (EFS, OVS): miR-34a, miR-23a, miR-92a, miR-490-3p,

and miR-130b. Successivi step di validazione hanno mostrato come l'associazione fosse particolarmente robusta per miR-34a, che risulta un predittore indipendente della prognosi in analisi multivariata. Pazienti con alta espressione di miR-34a non hanno ricadute a 5 anni dalla diagnosi, mentre pazienti con bassa espressione ricadono entro 2 anni. Modelli cellulari in cui viene ricostituita l'espressione di miR34a sono caratterizzati da un fenotipo meno proliferativo, meno maligno e sensibile a doxorubicina e vincristina, due tra i chemioterapici più utilizzati nella terapia del sarcoma di Ewing (Nakatani et al., 2012).

I long non-coding RNAs (lncRNA, o lincRNA - long intergenic non-coding RNA), sono RNA di lunghezza pari ad almeno 200nt, trascritti dalla RNA polimerasi II a partire da promotori indipendenti, presentano modificazioni epigenetiche quali H3K4me3 intorno al sito di inizio della trascrizione e H3K36me3 lungo il corpo del gene, possono andare incontro a splicing del trascritto primario per formare un trascritto maturo, e, per definizione, non contengono open reading frames codificanti per proteine (Prensner and Chinnaiyan, 2011). La loro funzione è quella di regolatori dell'espressione genica. La loro lunghezza li rende proni alla formazione di strutture complesse, per cui l'interazione con i target non avviene unicamente in base all'appaiamento di sequenza, ma anche sfruttando interazioni definite da strutture tridimensionali. La localizzazione cellulare dei lincRNA può essere nucleare o citoplasmatica: nel nucleo, sono in grado di reclutare complessi di rimodellamento della cromatina in specifici loci, o agire da decoy sequestrando fattori di trascrizione e sottraendoli ai rispettivi target genomici; nel citoplasma, possono regolare la stabilità o la traduzione di specifici mRNA, o agire come decoy di miRNA (miRNA sponges). Inoltre, in base al raggio di interazione con gli altri geni, i lncRNA sono classificati in *cis*-acting (influenzano l'espressione di geni vicini al proprio locus genomico), oppure *trans*-acting (influenzano l'espressione di geni lontani rispetto al proprio locus genomico) (Deniz and Erman, 2017). Mentre la disregolazione e il ruolo di diversi lncRNA siano ormai ben descritti in diversi tipi di tumori epiteliali quali carcinoma prostatico, mammario, coloretale, polmonare, epatocellulare, e della vescica (Bhan et al., 2017), molto meno si sa del loro coinvolgimento nei sarcomi. Ad oggi sono descritti in letteratura solo due lncRNA con ruolo oncogenico nel sarcoma di Ewing: lncRNA277 (EWSAT1) e MALAT1. EWSAT1 viene upregolato da EWS-FLI1 e collabora con esso nel mediare la regolazione dell'espressione genica, interagendo con la ribonucleoproteina HNRNPK; il silenziamento di EWSAT1 risulta in una riduzione della proliferazione e della crescita clonogenica (Marques Howarth et al., 2014); MALAT1 viene upregolato nel sarcoma di Ewing tramite una pathway mediata da SYK (chinasi la cui azione pro-crescita cellulare è stata solo recentemente descritta in questo sarcoma) e c-myc, e assume una funzione fortemente oncogenica di promozione della crescita e progressione attraverso il ciclo cellulare (Sun et al., 2017).

1.5 Trattamento

Il trattamento del sarcoma di Ewing si basa su un approccio multimodale di controllo locale tramite chirurgia, radioterapia (RxT), o entrambe, accoppiato a controllo sistemico tramite chemioterapia (Ctx) neoadiuvante ed adiuvante, cioè somministrata sia prima che dopo il controllo locale. Lo scopo di questo approccio nel trattamento sistemico è di facilitare il controllo locale, eradicare eventuali micrometastasi, e combattere eventuali recidive.

La scelta del tipo di controllo locale è influenzata da fattori quali età del paziente, sede e dimensioni tumorali. L'approccio chirurgico è preferibile ogni qualvolta si possa ottenere una resezione ampia o marginale; le amputazioni sono raramente indicate e possono essere sostituite da rotoplastica in bambini di età appropriata. L'approccio chirurgico, ove applicabile, fornisce il vantaggio di poter valutare la risposta tissutale alla chemioterapia neoadiuvante sulla base dell'analisi istologica del pezzo operatorio. Sebbene la radiosensibilità del sarcoma di Ewing sia ben comprovata, la radioterapia come trattamento locale singolo è associata a ricorrenze fino al 30-35% dei casi, e ad oggi è indicata unicamente per lesioni non operabili. È inoltre raccomandata in fase post-operatoria in caso di resezione chirurgica non completa in pazienti con scarsa risposta istologica e, in Europa, viene giudicata utile al controllo locale anche in caso buona risposta istologica. La somministrazione della radioterapia in setting pre-operatorio è stata introdotta più recentemente in pazienti per cui ci si attendono margini ristretti; in questi casi però la valutazione della risposta istologica sul pezzo operatorio non è affidabile (Gaspar et al., 2015).

Il controllo sistemico si basa su 3-6 cicli di chemioterapia pre-controllo locale somministrati a intervalli di 3 settimane, a cui seguono 6-10 cicli di chemioterapia post-controllo locale; la durata totale del trattamento è di 8-12 mesi. Gli agenti chemioterapici maggiormente utilizzati sono doxorubicina (A), ciclofosfamide (C), ifosfamide (I), vincristina (V), dactinomicina (Ac) ed etoposide (E); la maggior parte dei protocolli utilizza combinazioni di 4-6 di questi farmaci, e le più efficaci comprendono almeno un agente alchilante (ifosfamide o ciclofosfamide) e doxorubicina (Paulussen et al., 2009). Esiste un certo grado di variabilità nei protocolli applicati nei singoli centri di cura; lo standard presso l'Istituto Ortopedico Rizzoli di Bologna è attualmente basato sul protocollo ISG/SSGIII che prevede: chemioterapia di induzione basata sulla combinazione di 6 farmaci (VAC-IVAc-VAC-IE); chemioterapia di mantenimento per pazienti con buona risposta istologica VAC-IVAc-IE-VAC-IVAc-IE-VAC-IVAc-IE (37 settimane); mantenimento per pazienti con scarsa risposta istologica basato su chemioterapia ad alte dosi VAC-CE*-VAC-IE seguita da trapianto

cellule staminali da sangue periferico in seguito a trattamento con Busulfano e Melfalano (25 settimane) (Ferrari et al., 2011). Allo scopo di uniformare il trattamento a livello internazionale, è in corso uno studio clinico di fase III che confronta i protocolli Europei con quelli Nordamericani (EuroEwing2012, EudraCT 2012-002107-17).

Al termine del trattamento, viene impostato il follow-up dei pazienti per monitorare possibili recidive o effetti di tossicità legati alla chemioterapia che comprendono: danni alla funzione renale (a breve termine), danni alla funzione cardiaca o polmonare (solitamente evidente a lungo termine), possibile sviluppo di tumori secondari nelle aree irradiate o leucemie indipendenti dalla radioterapia (Paulussen et al., 2009).

1.6 Fattori prognostici

La presenza di metastasi alla diagnosi è universalmente riconosciuta come il fattore prognostico più importante nel sarcoma di Ewing: pazienti con malattia disseminata alla diagnosi hanno una probabilità di sopravvivenza a 5 anni inferiore al 30%. Lo studio EuroEwing99 ha elaborato un sistema di stratificazione in sottogruppi di rischio all'interno di questa categoria, tenendo conto del tipo e dall'estensione delle lesioni, dal volume del tumore primario, e dall'età. Combinando queste caratteristiche in uno score che assegna 1 punto a fattori quali età >14 anni, presenza di metastasi del midollo osseo, presenza di singola metastasi ossea, presenza di metastasi ossee e polmonari insieme, ed 1.5 punti a fattori quali volume del tumore primario >200ml e presenza di lesioni ossee multiple, vengono individuate tre categorie di rischio: gruppo 1 (score ≤ 3 , 50% dei casi analizzati) con sopravvivenza libera da malattia (event-free survival, EFS) pari al 50%; gruppo 2 (score >3 e inferiore a 5) con EFS del 25%; gruppo 3 (score ≥ 5) con EFS del 10% (Ladenstein et al., 2010).

Per i pazienti con malattia localizzata alla diagnosi, gli attuali protocolli di terapia hanno permesso di raggiungere una sopravvivenza a 5 anni pari a circa il 70%. I fattori prognostici che in Europa vengono utilizzati per adattare la terapia in base al rischio per questa classe di pazienti includono: risposta istologica alla chemioterapia valutata sul pezzo operatorio in tumori resectabili (si definiscono poor responders casi con necrosi <95% (Oberlin et al., 2001), o casi classificati come grado 2 o 3, micro- o macro-foci di cellule tumorali vitali, rispettivamente, (Picci et al., 1997)) e dimensioni o volume del tumore primario in tumori non resectabili (i pazienti vengono categorizzati come ad alto rischio se il diametro massimale è >8cm o se il volume è >200ml). Altri fattori clinici con valore prognostico (ma non utilizzati nelle decisioni relative al protocollo di terapia) includono

età, febbre ed elevati livelli di LDH. È importante infine ricordare che un fattore prognostico fortemente negativo è la recidivazione di malattia. La maggior parte delle ricorrenze si verifica entro i 3 anni di follow-up e la sopravvivenza in questi casi è inferiore al 25% (Paulussen et al., 2009). Diversi studi clinici di fase III sono ad oggi in corso con l'obiettivo di ottimizzare i protocolli terapeutici per i diversi gruppi di rischio identificati sulla base di queste caratteristiche: EWING2008 (ClinicalTrial.gov identificativo NCT00987636), ISG/AIEOP-EW1 (ClinicalTrial.gov identificativo NCT02063022), REECUR (EudraCT identificativo 2014-000259-99) (Gaspar et al., 2015).

Nonostante i protocolli terapeutici attuali abbiano portato ad un miglioramento sostanziale dell'aspettativa di vita dei pazienti con diagnosi di sarcoma di Ewing (la sopravvivenza prima dell'introduzione della chemioterapia era solo del 10%), si stima che nel complesso solo il 55% di essi riceva il trattamento appropriato. I dati di sopravvivenza attuali infatti ci dicono che: 80/100 nuovi pazienti diagnosticati hanno malattia localizzata alla diagnosi e di questi 60 sopravvivono (75%); 20/100 pazienti diagnosticati hanno malattia diffusa alla diagnosi, 5/20 con metastasi polmonari (2 di questi, 40%, sopravvivono) e 15 con altre metastasi (1 di questi sopravvive, 6%). In tutto sopravvivono 63 pazienti, 8 dei quali (tra quelli con malattia localizzata alla diagnosi) sarebbero sopravvissuti anche in assenza di chemioterapia. In tutto sono quindi 55/100 pazienti che hanno ricevuto un approccio terapeutico adeguato, mentre 65 sono stati sottoposti ad una terapia inefficace o non necessaria (Balamuth and Womer, 2010).

In questo quadro, la scoperta e lo sviluppo di biomarcatori molecolari è ampiamente auspicabile per poter indirizzare ciascun paziente ad un protocollo terapeutico personalizzato in base al rischio, e che sia il più efficace e meno tossico possibile.

2. Biomarcatori tumorali

2.1 Generalità e definizioni

Secondo la risorsa BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools), recentemente sviluppata da FDA (Food and Drugs Administration) ed NIH (National Institute of Health) allo scopo di armonizzare la terminologia utilizzata in ambito traslazionale, si definisce Biomarcatore 'una caratteristica misurata come indicatore di un processo biologico normale, patologico, o della risposta ad un'esposizione o intervento, incluso un intervento terapeutico. Caratteristiche molecolari, istologiche, radiografiche o fisiologiche sono tipi di biomarcatori.

Sulla base del tipo di informazione restituita, e dell'utilizzo clinico che ne deriva, vengono classificati

diversi tipi di biomarcatori; quelli di maggiore rilevanza in ambito oncologico includono biomarcatori di suscettibilità o rischio, biomarcatori diagnostici, biomarcatori prognostici e biomarcatori predittivi.

- *Biomarcatori di suscettibilità o rischio:* indicano il potenziale di sviluppo di un determinato tipo di tumore in un individuo che non presenta in quel momento segni clinici di malattia. Un classico esempio di questo tipo di biomarcatori è la presenza di mutazioni germline a carico dei geni BRCA1/2, associata ad un aumentato rischio di sviluppo di cancro della mammella e dell'ovaio (Easton et al., 1995; Hall et al., 1990; Struwing et al., 1997; Thorlacius et al., 1998). L'effettiva utilità clinica dei biomarcatori di suscettibilità dipende fortemente dalla disponibilità di strategie di prevenzione o riduzione del rischio (nel caso citato, controlli di screening più frequenti, chemioterapia preventiva, o mastectomia bilaterale) (Henry and Hayes, 2012).
- *Biomarcatori diagnostici:* vengono utilizzati per detectare o confermare la presenza di una certa malattia o condizione, e/o per identificare individui con uno specifico sottotipo di quella malattia o condizione. Lo sviluppo di questo tipo di biomarcatori dipende fortemente dalla performance clinica in termini di sensibilità (% di individui affetti da malattia che risultano positivi al test) e specificità (% di individui non affetti da malattia che risultano negativi al test). Un esempio di biomarcatore diagnostico recentemente entrato in commercio è Cologuard, per la diagnosi precoce del carcinoma coloretale nelle feci di individui a medio rischio, basato sulla rilevazione di mutazioni a carico di KRAS e metilazione aberrante di NDRG4 e BMP3, insieme ad un saggio immunostochimico per l'emoglobina (sensibilità: 92.3%, specificità: 86.6%)(Henry and Hayes, 2012)
- *Biomarcatori prognostici:* indicano la probabilità del verificarsi di un evento clinico (ricorrenza o progressione) in pazienti precedentemente diagnosticati per una certa malattia o condizione clinica, indipendentemente dal tipo di trattamento. In ambito oncologico, la valutazione della prognosi del paziente si è storicamente basata sulla valutazione delle caratteristiche clinico-patologiche (sede e dimensioni tumorali, stato di diffusione della malattia); le moderne tecniche di indagine molecolare stanno permettendo un crescente utilizzo a questo scopo di caratteristiche molecolari come ad esempio livelli di espressione di specifici geni, o profili di espressione genica. Ad esempio, nel carcinoma mammario è stato sviluppato un sistema di scoring basato sull'espressione di un pannello di 21 geni che descrive la probabilità di ricorrenza e sopravvivenza in pazienti linfonodo-negativi trattati con tamoxifene (Paik et al., 2004).
- *Biomarcatori predittivi:* identificano individui con una maggiore probabilità di rispondere all'esposizione ad un farmaco o agente ambientale. La risposta può manifestarsi come alleviamento dei sintomi, miglioramento della sopravvivenza, o evento avverso. Questi biomarcatori forniscono informazioni utili alle decisioni relative al trattamento dei pazienti,

identificando chi verosimilmente può trarre beneficio dall'utilizzo di uno specifico approccio terapeutico. Esempi di biomarcatori predittivi correntemente utilizzati in clinica includono: mutazioni somatiche a carico di KRAS nel carcinoma coloretale (pazienti mutati hanno una scarsa risposta alla terapia con anticorpi monoclonali anti-EGFR quali Cetuximab o Panitumumab) (Allegra et al., 2009); overespressione o amplificazione di HER2 nel carcinoma mammario (associati a migliore esito clinico in seguito a trattamento con anticorpi monoclonali anti-HER2) (Piccart-Gebhart et al., 2005; Romond et al., 2005); sempre nel carcinoma mammario, la positività per l'espressione di ER (estrogen receptor) predice la sensibilità alla terapia endocrina con tamoxifene (Jordan, 2004).

La scoperta di nuovi biomarcatori può derivare dallo studio della biologia del tumore o da approcci high-throughput (next-generation sequencing, microarray di espressione, studi di proteomica). L'effettivo utilizzo clinico di un nuovo biomarcatore passa attraverso le fasi di validazione analitica e clinica. La *validazione analitica* comprende studi riguardanti gli aspetti tecnici di misurazione del biomarcatore, ovvero studi che valutano l'adeguata sensibilità, specificità e robustezza del saggio utilizzato nella misurazione, che deve inoltre essere accurato e riproducibile in diversi laboratori. La *validazione clinica* fa riferimento agli studi tesi a dimostrare che il biomarcatore è in grado di discriminare in maniera affidabile due gruppi distinti nella popolazione (ad esempio: pazienti con elevata probabilità di ricorrenza vs gruppi con bassa probabilità di ricorrenza nel caso di biomarcatori prognostici, o pazienti con buona risposta ad un specifico tipo di terapia vs pazienti con scarsa risposta a quel tipo di terapia, nel caso di biomarcatori predittivi) (Henry and Hayes, 2012). Studi volti alla valutazione di parametri quali efficacia comparativa, rapporti rischio/beneficio e/o costo/efficacia legati all'utilizzo di un candidato biomarcatore concorrono (insieme agli studi di validazione precedentemente citati) a definire il quadro di *utilità clinica* relativo a quel biomarcatore. (Goossens et al., 2015; Henry and Hayes, 2012). Idealmente, un nuovo biomarcatore deve dimostrare 'elevata utilità clinica con elevato livello di evidenza'. Le linee guida TMUGS (Tumor Marker Utility Grading System) sviluppate dall'ASCO (American Society of Clinical Oncology), individuano il massimo livello di evidenza (LOE) come quello proveniente da studi clinici prospettici disegnati specificamente per la valutazione di un biomarcatore di interesse (LOE I) o studi clinici prospettici in cui la valutazione del biomarcatore non è l'obiettivo primario (LOE II) (Hayes et al., 1996). Sebbene questi siano i setting ideali per lo studio e lo sviluppo di nuovi biomarcatori, la realizzazione di questo tipo di studi è economicamente dispendiosa e può richiedere tempistiche molto lunghe; un'alternativa che può permettere di raggiungere ugualmente un livello di evidenza adeguato è l'analisi retrospettiva di campioni raccolti in precedenti studi con design prospettico (setting prospettico-retrospettivo) (Simon et al., 2009).

2.2 *Biopsia liquida*

I biomarcatori possono essere rilevati a livello del tessuto tumorale, e quindi necessitare di una biopsia, oppure nel sangue, o altri fluidi biologici. L'utilizzo di biopsie è associato ad una serie di inconvenienti: le procedure sono spesso poco confortevoli per il paziente e possono comportare complicazioni cliniche (Overman et al., 2013); la quantità di materiale ottenuto è solitamente molto limitata, e spesso la qualità è insufficiente per gli studi molecolari; l'informazione ottenuta da indagini condotte su prelievi biotici rappresenta una fotografia statica di una porzione del tumore, che verosimilmente sottostima l'eterogeneità intra- ed inter-tumorale (Gerlinger et al., 2012); l'invasività della procedura rende difficilmente applicabile l'ottenimento seriale di biopsie, e di conseguenza impedisce il monitoraggio nel tempo di un determinato biomarcatore tissutale.

È da lungo tempo noto che nel sangue circola una quota di DNA libero (cfDNA); nei pazienti oncologici, i livelli di cfDNA sono più elevati rispetto a soggetti sani (Leon et al., 1977), e almeno una quota del cfDNA è di diretta derivazione tumorale (ctDNA): le alterazioni genetiche caratteristiche del tessuto tumorale possono essere detectate nel plasma di questi pazienti (Sorenson et al., 1994). Ad oggi, il tipo di alterazioni che possono essere ricercate nel plasma dei pazienti spaziano dalla singola mutazione ad analisi di whole-genome sequencing. Le moderne tecniche di next generation sequencing sono infatti state applicate con successo all'analisi del cfDNA, rendendo possibile lo studio di un ampio spettro di alterazioni di derivazione tumorale nel sangue. L'analisi delle caratteristiche genetiche e molecolari dei tumori in maniera non invasiva per il paziente tramite la raccolta di prelievi di sangue o altri fluidi biologici è ciò che viene denominato oggi 'biopsia liquida' (Wan et al., 2017). I vantaggi della biopsia liquida rispetto a quella convenzionale comprendono la non invasività per il paziente (che rende possibile l'ottenimento di maggiori quantità di materiale biologico, a diverse tempistiche), e una maggiore rappresentatività dell'eterogeneità tumorale, visto che il ctDNA non deriva da una porzione fisicamente definita del tumore ma dal complesso delle cellule tumorali presenti nell'organismo (Crowley et al., 2013).

Le possibili applicazioni cliniche della biopsia liquida sono molteplici. Uno degli utilizzi di maggiore interesse riguarda la determinazione dello stage e della prognosi. È stato dimostrato che la concentrazione del ctDNA in pazienti in stadio avanzato è intorno alle 100 volte superiore rispetto a quella dei pazienti agli stadi primitivi. I livelli di ctDNA possono variare molto anche tra pazienti allo stesso stadio di malattia, variabilità che si ritiene essere il riflesso della correlazione del ctDNA con il volume tumorale e il grado di disseminazione metastatico. La positività per ctDNA è stata associata

ad una ridotta sopravvivenza in pazienti affetti da carcinoma coloretale, NSCLC e melanoma; i livelli di ctDNA correlano con un peggiore esito clinico in pazienti affetti da carcinoma mammario, carcinoma ovarico e melanoma (Wan et al., 2017).

La non invasività della biopsia liquida rende possibile il monitoraggio temporale della risposta alla terapia, della malattia minima residua ed eventuali ricorrenze. È stato mostrato nel carcinoma mammario come i livelli di ctDNA siano in grado di dare indicazione di risposta alla chemioterapia e di eventuale ricaduta in tempi molto più brevi rispetto ad altri marcatori più comunemente utilizzati (es. CA15-3). Sebbene sia intuitivo pensare che risposta alla terapia significhi riduzione dei livelli di ctDNA, anche un transiente aumento dei livelli di questi a breve distanza dall'inizio della terapia può esserne indicativo, in conseguenza all'aumento di morte cellulare (Wan et al., 2017). Il rilevamento di ctDNA al primo follow up dopo chirurgia con intento curativo si è visto essere associato ad una ridotta sopravvivenza libera da ricadute in carcinoma coloretale e mammario; l'intervallo tra il rilevamento di ctDNA dopo trattamento e ricaduta clinica è in media di 10 mesi, suggerendo che la biopsia liquida possa aiutare a guidare le decisioni terapeutiche relative ai pazienti non rispondenti o con alto rischio di ricaduta in anticipo rispetto al verificarsi della ricaduta stessa (Garcia-Murillas et al., 2015; Tie et al., 2016).

3. Biomarcatori molecolari nel sarcoma di Ewing

Numerosi biomarcatori sono stati studiati nel corso degli anni nell'ambito del sarcoma di Ewing, la maggior parte (se non la totalità) dei quali appartenenti alla categoria dei biomarcatori prognostici (Shukla et al., 2013). L'obiettivo alla base è quello di arrivare a disporre di una serie di strumenti molecolari per un'appropriata stratificazione dei pazienti in base al rischio alla diagnosi, in modo da poterli orientare al protocollo terapeutico più indicato alle specifiche caratteristiche del tumore: pazienti definiti ad alto rischio potrebbero per esempio essere indirizzati a regimi terapeutici basati su alte dosi di chemioterapia, mentre quelli a basso rischio potrebbero essere indirizzati a protocolli meno aggressivi, evitando o riducendo gli effetti di tossicità legati alla chemioterapia. Ad oggi, non è ancora stato raggiunto il livello di evidenza necessario all'utilizzo di questi biomarcatori nella pratica clinica, per cui le decisioni relative alla gestione dei pazienti sono ancora informate principalmente dalle caratteristiche clinico-patologiche.

3.1 Biomarcatori validati in studi prospettici

Ad oggi i biomarcatori valutati in studi prospettici includono la tipologia del trascritto di fusione e alterazioni a carico di CDKN2A e/o di p53. Diversi studi condotti su campioni d'archivio hanno evidenziato in passato un'associazione tra prodotto di fusione EWS-FLI1 di tipo 1 e migliore EFS in pazienti con malattia localizzata alla diagnosi (Zoubek et al., 1998), o migliore OVS sia in pazienti con malattia localizzata che metastatici alla diagnosi (de Alava et al., 1998). Delezioni di CDKN2A (p16^{INK4A/ARF}) colpiscono fino al 30% dei pazienti, e sono state associate a ridotta sopravvivenza e presenza di metastasi alla diagnosi in studi condotti su campioni d'archivio (Maitra et al., 2001; Wei et al., 2000), e meta-analisi con numerosità fino a 188 pazienti (Honoki et al., 2007). Alterazioni a carico di p53 (mutazioni od over-espressione) colpiscono il 10-15% dei pazienti, e sono state associate a fattori prognostici negativi quali presenza di metastasi alla diagnosi, scarsa risposta al trattamento e ridotta sopravvivenza in studi retrospettivi con numerosità fino a 324 pazienti (Abudu et al., 1999; de Alava et al., 2000; Huang et al., 2005; Lopez-Guerrero et al., 2011).

Gli studi prospettici EuroEwing 99 (Le Deley et al., 2010) e del COG (Children's Oncology Group) (van Doorninck et al., 2010) non hanno confermato una relazione statisticamente significativa tra il tipo di trascritto di fusione e l'esito clinico in analisi condotte su gruppi di 578 e 119 pazienti, rispettivamente. L'interpretazione che viene data a questi risultati è che i moderni protocolli di chemioterapia hanno eliminato lo svantaggio di sopravvivenza legato traslocazioni diverse da EWS-FLI1 di tipo1.

Un recente studio prospettico COG (Lerman et al., 2015) ha identificato mutazioni di p53 in 8/93 e delezioni di CDKN2A in 12/117 pazienti valutabili, rispettivamente. Lo status mutazionale di questi geni non è risultato essere associato ad EFS, motivo per cui gli autori hanno concluso che p53 e CDKN2A non siano biomarcatori affidabili nel sarcoma di Ewing. Questi risultati sottolineano l'importanza del disegno degli studi clinici nello sviluppo di nuovi biomarcatori.

3.2 Biomarcatori in corso di validazione prospettica

La valutazione della malattia minima residua (MRD), parte integrante della gestione di tumori pediatrici come ad esempio la leucemia linfoblastica acuta, è oggetto di forte interesse nell'ambito del sarcoma di Ewing. Schleiermacher e colleghi hanno dimostrato che i trascritti di fusione EWS-FLI1 ed EWS-ERG possono essere detectati tramite RT-PCR in campioni di midollo osseo (BM) o sangue periferico (PB) ottenuti alla diagnosi da 131 e 144 pazienti, rispettivamente. I risultati dello

studio hanno indicato una relazione tra positività del BM e presenza di metastasi alla diagnosi, e tra positività del PB e volume tumorale >200ml, due noti fattori prognostici negativi nel sarcoma di Ewing. Inoltre, in pazienti con malattia clinicamente definita come localizzata alla diagnosi, la rilevazione del trascritto di fusione nel BM o PB è associata ad un ridotto EFS (Schleiermacher et al., 2003). Altri studi applicando lo stesso approccio (su serie di pazienti meno estese) hanno ottenuto risultati contrastanti. Un approccio alternativo per la valutazione della MRD è basato sulla ricerca tramite citofluorimetria di cellule non ematopoietiche (CD45-/CD3-/CD14-/CD16-/CD19-), positive per CD99 e CD90 in campioni midollari. Lo studio di Ash e colleghi pur non rilevando una correlazione tra grado di coinvolgimento del midollo e sopravvivenza, osserva un ridotto EFS in pazienti con cellule tumorali midollari positive per CD56 (Ash et al., 2011). Un maggiore livello di evidenza a favore dell'inclusione di queste valutazioni nella pratica clinica potrà derivare dai risultati degli studi prospettici EuroEwing 99 e AEWS07B1, rispettivamente.

3.3 Biomarcatori validati in studi retrospettivi

Il potenziale impatto delle alterazioni del copy number sull'esito clinico è stata oggetto di numerosi studi retrospettivi. Le alterazioni più frequenti nel sarcoma di Ewing (trisomia 8, 12 e amplificazioni 1q) non sono statisticamente associate ad EFS od OVS (sebbene esista un trend); amplificazioni di 6p21.1 o la trisomia del cromosoma 20 risultano statisticamente associate ad EFS ed OVS, anche se solo con alcune tecniche di indagine (Shukla et al., 2013); l'indice MCN (Multifactor Copy Number), che tiene conto del numero di anomalie presenti contemporaneamente in un campione tra quelle dimostrate associate alla sopravvivenza in analisi univariata, è associato ad EFS ed OVS (Jahromi et al., 2012). Sebbene questi studi abbiano spesso evidenziato una relazione tra queste alterazioni e l'esito clinico, la variabilità dei risultati tra studi che utilizzano tecniche di indagine diverse, insieme all'assenza di studi prospettici a riguardo, risulta in uno stadio di sviluppo globalmente meno avanzato per questo tipo di marcatori.

Diversi sono anche gli studi che hanno indagato l'associazione tra i livelli di espressione di specifici geni e l'esito clinico dei pazienti. Caratteristiche molecolari associate ad un peggiore esito clinico includono: espressione di VEGF, overespressione di PBF, espressione nucleare di NPM, alta espressione di CCN3, alta espressione di GSTM4, espressione di Xg, alta espressione di CXCR4 e CXCR7, alta espressione di Cx43; caratteristiche molecolari associate ad un migliore esito clinico includono: espressione di VEGF (risultato discordante con precedenti lavori), bassa espressione di MGST1, espressione di LGALS3BP (Shukla et al., 2013).

La maggior parte di questi studi è stata condotta su numeri limitati di pazienti, e su casistiche eterogenee per caratteristiche clinico-patologiche (ad esempio casistiche che includono sia pazienti con malattia localizzata che metastatica alla diagnosi) e/o per protocolli terapeutici applicati. Per questi motivi, il livello di evidenza a favore dell'impatto clinico di queste molecole necessita di essere integrato da ulteriori steps di validazione, partendo dalla validazione in casistiche retrospettive più ampie costituite da campioni raccolti prospetticamente (setting prospettico-retrospettivo), fino ad arrivare all'inclusione dei biomarcatori più promettenti in studi prospettici.

SCOPO DELLA TESI

Il sarcoma di Ewing è un tumore di origine mesenchimale estremamente aggressivo e con tendenza a dare metastasi, che colpisce prevalentemente adolescenti e giovani adulti. Il trattamento si basa su un approccio combinato di controllo locale tramite chirurgia con o senza radioterapia, e sistemico tramite chemioterapia pre e post operatoria. I fattori prognostici che attualmente dirigono le decisioni inerenti il trattamento di questi pazienti sono di natura clinico-patologica ed includono: presenza o assenza di metastasi alla diagnosi (considerato il fattore prognostico più importante), risposta istologica alla chemioterapia (valutabile come livello di necrosi su pezzo operatorio nei tumori resectabili), dimensioni o volume tumorale alla diagnosi (nei tumori non resectabili) (Gaspar et al., 2015).

Sebbene la sopravvivenza per pazienti con malattia localizzata sia intorno al 70%, questi pazienti spesso soffrono di sostanziali effetti di tossicità acuta o a lungo termine legata alla chemioterapia; per questo motivo, e anche considerata la giovane età dei pazienti, è auspicabile lo sviluppo di biomarcatori molecolari che ne permettano un'opportuna stratificazione in base al rischio alla diagnosi, con il conseguente orientamento ad un protocollo terapeutico che massimizzi la probabilità di cura e minimizzi quella di sequele a lungo termine.

Ad oggi, diversi studi hanno indagato l'impatto di alterazioni genomiche o dei livelli di espressione di specifiche molecole sull'esito clinico di pazienti affetti da Sarcoma di Ewing (Shukla et al., 2013). Limitazioni spesso sofferte da questi studi e che ostacolano il passaggio all'utilizzo clinico di nuovi biomarkers includono: numero limitato di pazienti, eterogeneità delle casistiche, limitate informazioni sulla storia dei campioni, tecniche di valutazione laboriose e/o difficilmente standardizzabili in diversi laboratori.

Due potenziali candidati biomarkers prognostici per il sarcoma di Ewing sono LGALS3BP e miR-34a. In uno studio del 2009, l'espressione di LGALS3BP è stata valutata in 247 tumori primari tramite immunoistochimica (IHC) e in 47 tumori primari tramite PCR Realtime, mostrando come alti livelli di espressione di questa molecola fossero associati ad un migliore esito clinico (Zambelli et al., 2010). In uno studio più recente, l'espressione di miR-34a è stata valutata in 109 tumori primari tramite PCR Realtime evidenziando come pazienti alto-esprimenti avessero un migliore esito clinico rispetto ai basso-esprimenti; viene inoltre suggerito come il possibile ruolo oncosoppressore di miR-34a nel sarcoma di Ewing possa esplicitarsi tramite l'inibizione degli effetti del suo target Ciclina D1 (CCND1) (Marino et al., 2014; Nakatani et al., 2012).

Lo scopo del presente studio è stato in primo luogo la validazione del valore prognostico dei livelli di espressione di queste due molecole (valutati tramite PCR Realtime) in una casistica estesa a 125 tumori primari localizzati alla diagnosi ottenuti da pazienti trattati presso l'Istituto Ortopedico Rizzoli di Bologna. Considerata l'importanza di poter arrivare a valutare e monitorare un biomarker in maniera rapida e non invasiva, è stata inoltre esplorata la fattibilità della quantificazione dei livelli plasmatici di miR-34a in un gruppo più ristretto di pazienti.

Alla luce delle evidenze a favore di un ruolo onco-soppressivo di miR-34a nel sarcoma di Ewing e allo scopo di approfondirne il potenziale meccanismo d'azione, sulla stessa casistica di 125 tumori primari è stata valutata la relazione tra i livelli di espressione di questo miRNA e le due isoforme di CCND1, entrambe target di EWS-FLI1, il fattore trascrizionale aberrante risultante dalla traslocazione caratteristica di questo tumore (Sanchez et al., 2008); parallelamente, è stato costituito e caratterizzato *in vitro* ed *in vivo* un modello cellulare di over-espressione stabile di questo miRNA, come base per ulteriori studi meccanicistici.

Infine, allo scopo di identificare alterazioni genomiche tumore specifiche correlate alla risposta alla chemioterapia, è stato sfruttato un approccio di whole transcriptome sequencing su un gruppo di 15 biopsie pre-trattamento in pazienti selezionati a posteriori sulla base della diversa risposta alla chemioterapia: 8 good responders (GR), che non hanno avuto ricadute a 6 anni dal trattamento, e 7 poor responders (PR), con rapida ricaduta, generalmente durante la chemioterapia stessa. Particolare attenzione è stata volta all'identificazione di SNV ricorrenti e con frequenza differenziale nei due gruppi di pazienti; inoltre, essendo ad oggi il trascrittoma non-protein coding relativamente poco esplorato nel sarcoma di Ewing, abbiamo cercato di identificare lincRNAs con livelli di espressione differenziale nei due gruppi di pazienti.

MATERIALI E METODI

Selezione dei pazienti

Validazione del valore prognostico dei livelli di LGALS3BP e miR-34a

Sono stati inclusi nello studio di validazione retrospettiva del valore prognostico di LGALS3BP e miR-34a pazienti con diagnosi di Sarcoma di Ewing localizzato arruolati in studi prospettici attivati presso l'Istituto Ortopedico Rizzoli tra il 1987 e il 2013. Il comitato etico dell'Istituto ha approvato gli studi e dai pazienti è stato ottenuto il consenso informato. La diagnosi di sarcoma di Ewing è stata ottenuta a seguito di indagine istologica, citologica e immunohistochimica su biopsie aperte o ago-biopsie, e confermata da indagine molecolare per la presenza del trascritto chimerico risultante dalle traslocazioni tipiche del sarcoma di Ewing. Il trattamento locale, effettuato in seguito a chemioterapia di induzione, è stato scelto tra radioterapia (tumori giudicati non resectabili dal chirurgo o in caso di rifiuto dell' approccio chirurgico da parte del paziente), chirurgia (amputazione o chirurgia conservativa, effettuata ogni volta che una resezione con margini ampi è stata giudicata ottenibile), o chirurgia seguita da radioterapia. Nei pazienti sottoposti a chirurgia, la risposta alla chemioterapia di induzione è stata valutata come livello di necrosi sul pezzo operatorio come precedentemente descritto (Picci et al., 1997). La chemioterapia è stata effettuata secondo i protocolli neoadiuvanti ISG/SSGIII ed ISG/AIEOP-EW1 nella maggioranza dei pazienti, insieme ai meno recenti EW-REN2, EW-REN3, EW1, EW2. Per ciascun paziente sono stati calcolati event-free survival (EFS) definito come tempo intercorso (mesi) tra data della diagnosi e occorrenza di eventi avversi (recidive locali o metastasi distali) ed overall survival (OVS) definito come tempo intercorso (mesi) tra data della diagnosi e decesso dovuto al tumore.

Valutazione dei livelli di miR-34a circolante

Sono stati inclusi nello studio di fattibilità per la valutazione dei livelli di miR-34a circolante pazienti con diagnosi di sarcoma di Ewing (localizzato o metastatico alla diagnosi) arruolati nello studio prospettico PROVABES presso l'Istituto Ortopedico Rizzoli a partire dal 2014. Il comitato etico dell'Istituto ha approvato lo studio ed il consenso informato è stato ottenuto dai pazienti. Diagnosi e trattamento locale sono stati ottenuti/applicati analogamente a quanto descritto per i pazienti inclusi nella validazione retrospettiva, mentre i protocolli di chemioterapia applicati includono ISG/AIEOP-EW1 (Palmerini et al., 2017) ed ISG/AIEOP-EW2 per pazienti con malattia localizzata o metastatica alla diagnosi, rispettivamente.

Whole transcriptome sequencing e studio mutazioni TP53

Sono stati inclusi nello studio di whole transcriptome sequencing 15 pazienti con diagnosi di sarcoma di Ewing trattati presso l'Istituto Ortopedico Rizzoli secondo i protocolli ISG/SSG III-IV. La ricerca delle mutazioni a carico di TP53 identificate in questo primo gruppo di pazienti è stata successivamente estesa a 32 campioni ottenuti da 30 diversi pazienti.

Isolamento del plasma

Dai pazienti arruolati nello studio PROVABES, il sangue periferico è stato prelevato e raccolto in tubi contenenti EDTA come anticoagulante. In seguito a centrifugazione a 2000rpm per 10 minuti, il plasma è stato raccolto come frazione surnatante acellulare, suddiviso in aliquote di 250ul e conservato a -80°C fino alla data di estrazione dell'RNA.

Estrazione RNA

Da tumori primari (biopsie, ago-biopsie, o resezioni) congelati o linee cellulari, l'RNA totale è stato estratto utilizzando Trizol LS Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). La qualità dell'RNA così ottenuto è stata valutata tramite corsa elettroforetica (gel agarosio 1%) e/o analisi mediante Nanodrop (NanoDrop ND1000 ThermoFisher Scientific, Waltham, MA).

Partendo da aliquote di plasma congelato, l'RNA totale (inclusa la frazione di microRNA) è stato estratto utilizzando Qiagen miRNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) secondo le istruzioni del produttore (Supplementary protocol: Purification of total RNA, including small RNAs, from serum or plasma using the miRNeasy Mini Kit) con minime variazioni (utilizzo di oligonucleotidi sintetici cel-miR-39, cel-miR-54, cel-miR-238 come spike-in, Tabella 1).

Product	Name	Sequence
100nmole RNA oligo	Cel-miR-39	5' rUrCrA rCrCrG rGrGrU rGrUrA rArArU rCrArG rCrUrU rG 3'
100nmole RNA oligo	Cel-miR-54	5' rUrArC rCrCrG rUrArA rUrCrU rUrCrA rUrArA rUrCrC rGrArG 3'
100nmole RNA oligo	Cel-miR-238	5' rUrUrU rGrUrA rCrUrC rCrGrA rUrGrC rCrArU rUrCrA rGrA 3'

Tabella 1. Sequenze oligonucleotidi spike-in sintetici (Integrated DNA Technologies (IDT), Coralville, Iowa, USA)

Realtime PCR

Per la quantificazione di LGALS3BP, CCND1A e CCND1B su tessuto tumorale, 500ng di RNA sono stati retrotrascritti utilizzando High capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) secondo le istruzioni del produttore. Per la quantificazione di miR-34a su tessuto tumorale o linee cellulari, 10ng di RNA sono stati retrotrascritti utilizzando TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) secondo le istruzioni del produttore. I campioni così ottenuti sono stati amplificati in duplicato a 95 °C per 15 s e 60°C per 1 min (40 cicli) su piattaforma ABI Prism 7900 Sequence Detection System o ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA). Primers e chimiche di reazione sono riassunti in Tabella 2.

La quantificazione relativa è stata effettuata tramite il metodo del 2^{-ddCT} come precedentemente descritto (Marino et al., 2014; Zambelli et al., 2010), normalizzando i dati rispetto a GAPDH o RNU6B come controllo endogeno ed utilizzando colture primarie di cellule staminali mesenchimali (HSSC196 o HSSC163) come calibratore.

La quantificazione di miR-34a circolante è stata effettuata come descritto in (Kroh et al., 2010). Brevemente, 1.67ul (volume costante) di RNA ottenuto da plasma sono stati retro-trascritti per miR-34a, cel-miR-39, cel-miR-54 e cel-miR-238 (spike-in utilizzati al momento dell'estrazione) utilizzando TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) secondo le istruzioni del produttore. Una curva standard è stata costituita tramite diluizioni seriali di miR-34a (oligonucleotide sintetico). I campioni sono stati amplificati successivamente in duplicato a 95 °C per 15 s e 60°C per 1 min (40 cicli) su strumento ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA). I valori di Ct di miR-34a ottenuti da ciascun campione sono stati normalizzati rispetto alla mediana dei valori di Ct dei cel-miRs utilizzati come spike-in, e successivamente interpolati nella curva standard per ottenere la quantificazione in termini di copie/ul reazione

Target Gene	Primers/Probes	Vendor/Reference	Mastermix (reaction chemistry)
LGALS3BP	TaqMan gene expression Assay ID: Hs00174774_m1	Applied Biosystems	TaqMan™ Universal PCR Master Mix
GAPDH	Sense: 5'- GAAGGTGAAGGTCGGAGTC -3' Antisense: 5'- GAAGATGGTGATGGGATTTC - 3' Probe: 5'- GAAGCTTCCC GTTCTCAGCC - 3'	Custom primers (IDT)	TaqMan™ Universal PCR Master Mix
CCND1A	Sense: 5'-AGCTGTGCATCTACACCGAC-3' Antisense: 5'- ACTCCAGCAGGGCTTCGATCTG-3'	(Sanchez et al., 2008)	SYBR™ Green PCR Master Mix
CCND1B	Sense: 5'- CGAGGAGCTGCTGCAAATG-3' Antisense: 5'-TGGGACATCACCCCTCACTTAC-3'	(Sanchez et al., 2008)	SYBR™ Green PCR Master Mix

miR-34a	TaqMan microRNA Assay ID 000426	Applied Biosystems	TaqMan® Universal PCR Master Mix, no AmpErase® UNG
RNU6B	TaqMan microRNA Assay ID: 001093	Applied Biosystems	TaqMan® Universal PCR Master Mix, no AmpErase® UNG
cel-miR-39	TaqMan microRNA Assay ID: 000200	Applied Biosystems	TaqMan® Universal PCR Master Mix, no AmpErase® UNG
cel-miR-54	TaqMan microRNA Assay ID: 001361	Applied Biosystems	TaqMan® Universal PCR Master Mix, no AmpErase® UNG
cel-miR-238	TaqMan microRNA Assay ID: 000248	Applied Biosystems	TaqMan® Universal PCR Master Mix, no AmpErase® UNG

Tabella 2. Primers/probes utilizzati in PCR Realtime

RNA sequencing

250ng di RNA ottenuto da 15 biopsie di pazienti affetti da sarcoma di Ewing sono stati processati per la produzione delle libraries e sequenziati su piattaforma Illumina HiScanSQ presso il Laboratorio di Oncologia ed Ematologia pediatrica del Policlinico Sant’Orsola Malpighi. Le sequenze sono state mappate su genoma di riferimento (hg19) ed analizzate per verificare la presenza di trascritti di fusione, SNV, geni con espressione differenziale nel gruppo di pazienti definito come poor responder (PR) rispetto ai good responders (GR). Per l’identificazione di prodotti di fusione si è fatto riferimento ai prodotti identificati da almeno due dei seguenti software: DeFuse (McPherson et al., 2011), FusionMap (Ge et al., 2011) e ChimeraScan (Iyer et al., 2011). Gli SNV sono stati identificati tramite il software SNVMix2 (Goya et al., 2010) e filtrati attraverso i database dbSNPs e 1000 genomes per escludere polimorfismi annotati. Gli effetti dei cambiamenti nei codoni sulla funzionalità proteica sono stati valutati tramite SiFT e PROVEAN (Choi and Chan, 2015). L’identificazione di geni differenzialmente espressi è stata effettuata tramite edgeR.

Studio mutazioni TP53

Per la validazione delle mutazioni di TP53 identificate nel gruppo di campioni sottoposti a whole transcriptome sequencing, 20ng di DNA genomico sono stati amplificati in PCR classica con coppie di primers disegnate sugli introni 4-6, 6-7, 7-9. La ricerca di mutazioni a carico di TP53 è stata effettuata nella casistica di validazione amplificando 20 ng di DNA in PCR classica utilizzando primers che coprissero l’intera porzione codificante del gene. I risultanti prodotti di PCR sono stati sequenziati con metodo Sanger (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany). Le sequenze dei primers utilizzati sono riportate in Tabella 3.

Regione di TP53	Primer Forward (5'-3')	Primer Reverse (5'-3')
i4-i6	TCCTGAGGTGTAGACGCCAA	CTGGAGGGCCACTGACAAC
i6-i7	CCTGCTTGCCACAGGTCTC	CAGTAAGGAGATTCCCCGCC
i7-i9	GGCTCCAGAAAGGACAAGGG	CAAATGCCCAATTGCAGGT
Esoni 2-4	TCAGACACTGGCATGGTGTT	ATACGGCCAGGCATTGAAGT
Esoni 5-6	TCCTGAGGTGTAGACGCCAA	CTGGAGGGCCACTGACAAC
Esoni 7	CCTGCTTGCCACAGGTCTC	CAGTAAGGAGATTCCCCGCC
Esoni 8-9	GGCTCCAGAAAGGACAAGGG	CAAATGCCCAATTGCAGGT
Esoni 10	TGCATGTTGCTTTTGTACCGT	CTGGGACCCAATGAGATGGG
Esoni 11	AAAGGGGCACAGACCCTCTC	GCTGGTATGTCTACTCCCCA

Tabella 3. Primers utilizzati nella validazione delle mutazioni di TP53 in Sanger sequencing

Ottenimento di cloni cellulari over-esprimenti miR-34a

Per ottenere linee cellulari che over-esprimessero stabilmente miR-34a è stato utilizzato un vettore lentivirale basato su virus dell'immunodeficienza felina (FIV) (System Biosciences). Il disegno del costrutto comprende la struttura stem-loop di miR-34a insieme a 200bp di regioni genomiche fiancheggianti (upstream e downstream) clonate nel plasmide pMIF-cGFPZeo-miR. Il costrutto lentivirale pMIF-cGFPZeo-EV (vettore vuoto) è stato utilizzato come controllo. La produzione del vettore è stata ottenuta in cellule packaging 293TA (System Biosciences) utilizzando il Lenti-Pac FIV Expression Packaging Kit (FPK-LvTR-20) (Genecopeia) in presenza di Polybrene 8ug/ml, secondo le istruzioni del produttore.

Il surnatante lentivirale raccolto e filtrato è stato utilizzato in diluizioni seriali (1:10, 1:50; 1:250; 1:1000; 1:5000) per trasdurre la linea cellulare A673 di sarcoma di Ewing (fornita dal Laboratorio di Oncologia Sperimentale, Istituto Ortopedico Rizzoli di Bologna). Sono state seminate 50000 cellule/pozzetto in IMDM (Lonza) supplementato con 5% FBS (Lonza), Penicillina 20U/ml e Streptomycin 100ug/ml (Sigma) ed incubate a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂. A 72h dalla trasduzione le cellule sono state trapiantate in terreno di selezione contenente Zeocina 50ug/ml e mantenute in coltura fino alla morte del controllo mock transduced (circa 7 giorni). Si è poi proceduto alla valutazione dell'efficienza di trasduzione in base all'espressione di GFP (44.3% cellule GFP+ in A673 infettate con vettore a diluizione 1:10) (FACSCalibur, Beckton Dickinson).

L'efficienza di trasduzione subottimale ci ha spinti a seminare questa popolazione in condizioni di diluizione limitante allo scopo di isolare e caratterizzare singoli cloni: 43 cloni sono stati screenati per l'espressione di GFP (range 42.7-99.82% di positività); 10 di questi cloni (selezionati tra quelli con positività a GFP > 90%) sono stati processati per la verifica molecolare dell'over-espressione di miR-34a tramite PCR Realtime; 5 di questi cloni (selezionati in base a diversi livelli di espressione

di miR-34a), sono stati caratterizzati per caratteristiche di malignità *in vitro* e 2 *in vivo*.

Caratterizzazione in vitro di cloni over-esprimenti miR-34a

Crescita in monostrato

I cloni A673pMIF-miR-34a#11, #28, #31, #39 e #41 sono stati seminati in IMDM 10% FBS in fiasche T75 a 500000 cellule/fiasca. Il numero di cellule vive è stato calcolato giornalmente per 7 giorni tramite conta ad esclusione in Trypan Blue. A673 parentali e A673pMIF-EV sono state incluse come controllo.

Crescita in condizioni di ancoraggio-indipendenza

Sospensioni cellulari di 3300 cellule sono state ottenute dai cloni A673pMIF-miR-34a#11, #28, #31, #39 e #41 e seminate in duplicato in terreno semisolido costituito da IMDM 10% FBS + 0.33% soft agar (SeaPlaque, FMC BioProducts) in petri 60mm su base di soft agar 0.5%. Le petri sono state incubate a 37°C e 5% CO₂ in atmosfera umidificata, e a 7 giorni dalla semina è stata effettuata la conta delle colonie. A673 parentali e A673pMIF-EV sono state incluse come controllo.

Saggio di sensibilità ai farmaci

I cloni A673pMIF-miR-34a#11, #28, #31, #39 e #41 sono stati seminati a 2500cellule/pozzetto in IMDM 10% FBS e Pen/Strep e mantenuti in incubatore a 37°C e 5% CO₂. A 24h dalla semina, sono state aggiunte alle cellule in coltura diluizioni seriali dei farmaci Doxorubicina (3; 10; 100; 300; 600; 1000 ng/ml) e Vincristina (0.3; 0.6; 1; 3; 6; 10; 30 ng/ml). A 72h dall'inizio del trattamento, la proliferazione cellulare è stata valutata tramite Cell Proliferation Kit I (MTT) (Roche) secondo le istruzioni del produttore. Le IC₅₀ sono state calcolate tramite il software CalcuSyn (Biosoft). A673 parentali e A673pMIF-EV sono state incluse come controllo.

Caratterizzazione in vivo di cloni over-esprimenti miR-34a

Sospensioni cellulari di 2×10^6 cellule ottenute dai cloni A673pMIF-miR-34a#11 e #39 (così come da A673 parentali e A673-pMIF-EV come controllo) sono state iniettate sottocute (zampa destra) in topi NSG (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ) femmine (5 topi per gruppo) presso lo stabulario dell'Istituto di Cancerologia dell'Università di Bologna. Gli outcome valutati come misura della tumorigenicità di queste cellule includono incidenza, latenza, e dimensioni tumorali.

RISULTATI

1. Validazione del valore prognostico di LGALS3BP e miR-34a in una casistica di sarcoma di Ewing localizzato

Per validare la rilevanza prognostica di LGALS3BP e miR-34a nel sarcoma di Ewing, si è cercato innanzitutto di costituire una casistica di studio che fosse il più ampia ed omogenea possibile. Grazie ad una collaborazione con l'Istituto Ortopedico Rizzoli – Laboratorio di Oncologia Sperimentale, abbiamo avuto accesso alla banca di RNA estratti da 156 tumori primari provenienti da pazienti EWS trattati nell'Istituto tra il 1987 ed il 2013, di cui sono disponibili caratteristiche clinico patologiche e informazioni di follow-up.

Esclusi gli RNA provenienti da pazienti con metastasi alla diagnosi e i campioni di qualità insufficiente, abbiamo potuto costruire una casistica di riferimento costituita da 125 tumori primari localizzati alla diagnosi (Tabella 4). Su questa casistica è stata valutata l'espressione di LGALS3BP e miR-34a tramite Realtime PCR utilizzando cellule staminali mesenchimali (HSSC196 o HSSC163) come calibratore. Il dato di espressione definitivo è stato ottenuto in 117 e 124 casi per LGALS3BP e miR-34a rispettivamente.

Allo scopo di indagare la rilevanza dei valori di espressione di queste due molecole nel predire l'esito clinico dei pazienti, abbiamo utilizzato la mediana dei valori di espressione nella casistica come cut-off per stratificare i pazienti in alto-esprimenti (HIGH, con $2^{-ddCT} \geq$ valore mediano) o basso-esprimenti (LOW, con $2^{-ddCT} <$ valore mediano), e calcolato le curve di sopravvivenza di Kaplan-Meier per questi due gruppi di pazienti.

Caratteristiche	N°	%	Associazione con la prognosi (EFS)	Associazione con la sopravvivenza (OVS)
Genere				
Femmina	34	27.2	p=0.229	p=0.1396
Maschio	91	72.8		
Età				
≤ 14 anni	54	43.2	p=0.9489	p=0.6749
> 14 anni	71	56.8		
Sede				
Estremità	92	73.6	p=0.1194	p=0.2285
Centrale	18	14.4		
Pelvi	15	12		
LDH				
Normali	82	65.6	p=0.0042	p=0.0002
Alte	32	25.6		
n.a.	11	8.8		
Chirurgia				
SI	109	87.2	p=0.0016	p=0.0059
NO	16	12.8		
Trattamento Locale				
RxT	16	12.8	p=0.0152	p=0.0470
RxT + Chirurgia	24	19.2		
Chirurgia	85	68		
Protocollo chemioterapia				
ISG/SSG III	71	56.8	p=0.2434	p=0.3247
ISG/AIEOP EW1	21	16.8		
Altro	33	26.4		
Risposta alla chemioterapia				
Buona (GR)	44	35.2	p=0.0066	p=0.0364
Scarsa (PR)	68	54.4		
n.a.	13	10.4		
Tipo di traslocazione				
EWS/Fli-1 tipo I	66	52.8	p=0.4227	p=0.2794
EWS/Fli-1 non-tipo I	59	47.2		
EFS (Status)				
NED	77	61.6		
REL	48	38.4		
OVS (Status)				
ALIVE	93	74.4		
DEAD	32	25.6		

Tabella 4. Caratteristiche clinico-patologiche dei 125 casi affetti da sarcoma di Ewing localizzato alla diagnosi inclusi nella validazione retrospettiva del valore prognostico di LGALS3BP e miR-34a. RxT: Radioterapia. EFS: Event-free survival. OVS: Overall survival. NED: No evidence of disease. REL: Relapsed.

1.1 I livelli di espressione di LGALS3BP predicono l'esito clinico in analisi univariata

I livelli di espressione di LGALS3BP nella nostra casistica di 117 tumori localizzati si mostrano eterogenei e con una tendenza all'over-espressione in confronto alle cellule mesenchimali HSSC196 utilizzate come calibratore (Figura 1A-B). Utilizzando un cut-off esplorativo di 1.5 fold increase rispetto ad HSSC196, abbiamo osservato che la maggioranza dei casi over-esprime LGALS3BP ($2^{-ddCT} \geq 1.5$; 71/117 - 60.7%), un gruppo più ristretto mostra livelli di espressione inferiori ($2^{-ddCT} \leq 0.67$; 30/117 - 25.6%), mentre solo una minoranza mostra livelli di espressione comparabili ad HSSC196 ($0.67 < 2^{-ddCT} < 1.5$; 16/117 - 13.7%).

In seguito alla stratificazione in base ai valori mediani di espressione, le curve di Kaplan-Meier hanno confermato nella nostra casistica che pazienti alto-esprimenti hanno un migliore esito clinico sia in termini di EFS ($p=0.0236$) che di OVS ($p=0.0268$) rispetto a pazienti basso-esprimenti (Figura 1C). Eventi secondari (recidive locali o metastasi) si verificano in 16/59 (27.12%) pazienti alto-esprimenti contro 27/58 (46.55%) basso-esprimenti ($p=0.0357$ Fisher's exact test); decessi tumore-correlati si verificano in 10/59 (16.95%) pazienti alto-esprimenti e in 18/58 (31.03%) pazienti basso-esprimenti ($p=0.0861$ Fisher's exact test). L'impatto prognostico dei livelli di espressione di LGALS3BP sembra essere indipendente dalla risposta alla chemioterapia, in quanto pazienti classificati come good o poor responders (GR, PR) mostrano livelli di espressione comparabili (Figura 1D).

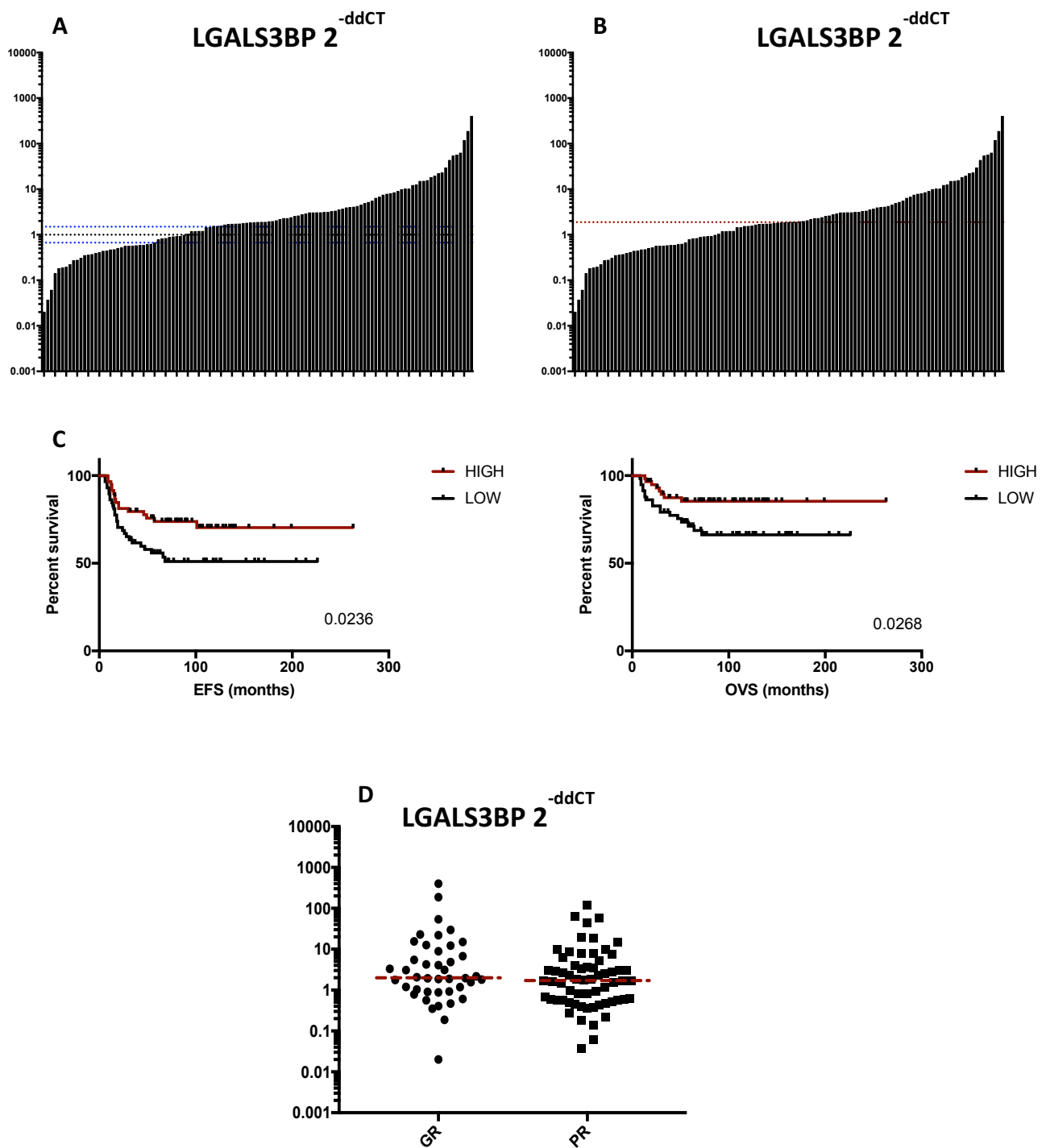


Figura 1. Espressione e valore prognostico di LGALS3BP in 117 pazienti affetti da sarcoma di Ewing localizzato alla diagnosi. A-B. Quantificazione relativa (2^{-ddCT}) rispetto al calibratore HSSC196. Il range di espressione di ± 1.5 fold increase rispetto al calibratore è evidenziato tra le linee tratteggiate in blu (A); il valore mediano dei livelli di espressione nella casistica è evidenziato con la linea tratteggiata in rosso (B). **C.** Curve di sopravvivenza calcolate per EFS ed OVS in seguito a categorizzazione dei pazienti in alto o basso-esprimenti (HIGH e LOW, rispettivamente). **D.** Espressione di LGALS3BP in pazienti con buona o scarsa risposta alla chemioterapia (GR e PR rispettivamente). La mediana dei livelli di espressione è evidenziata come linea tratteggiata in rosso.

1.2 I livelli di espressione di miR-34a predicono l'esito clinico in analisi univariata

I livelli di espressione di miR-34a nella nostra casistica di 124 tumori localizzati si mostrano eterogenei e con una tendenza alla sotto-espressione rispetto alle cellule staminali mesenchimali HSSC163 utilizzate come calibratore (Figura 2A-B). Considerato un range di ± 1.5 fold increase rispetto ad HSSC163, 97/124 pazienti (78.2%) mostrano livelli di espressione inferiori ($2^{-\text{ddCT}} \leq 0.67$), 14/124 pazienti (11.3%) mostrano livelli di espressione comparabili ($0.67 < 2^{-\text{ddCT}} < 1.5$), e 13/124 pazienti (10.5%) mostrano livelli di espressione superiori ($2^{-\text{ddCT}} \geq 1.5$).

In seguito alla stratificazione in base ai valori mediani di espressione, le curve di Kaplan-Meier hanno confermato nella nostra casistica che pazienti alto-esprimenti hanno un migliore esito clinico sia in termini di EFS ($p=0.0226$) che di OVS ($p=0.0048$) rispetto a pazienti basso-esprimenti (Figura 2C). Eventi secondari (recidive locali o metastasi) si verificano in 19/62 (30.65%) pazienti alto-esprimenti contro 29/62 (46.77%) basso-esprimenti ($p=0.0966$ Fisher's exact test); decessi tumore-correlati si verificano in 11/62 (17.74%) pazienti alto-esprimenti e in 21/62 (33.87%) pazienti basso-esprimenti ($p=0.0638$ Fisher's exact test). L'impatto prognostico dei livelli di espressione di miR-34a sembra essere indipendente dalla risposta alla chemioterapia, in quanto pazienti classificati come good o poor responders (GR, PR) mostrano livelli di espressione comparabili (Figura 2D).

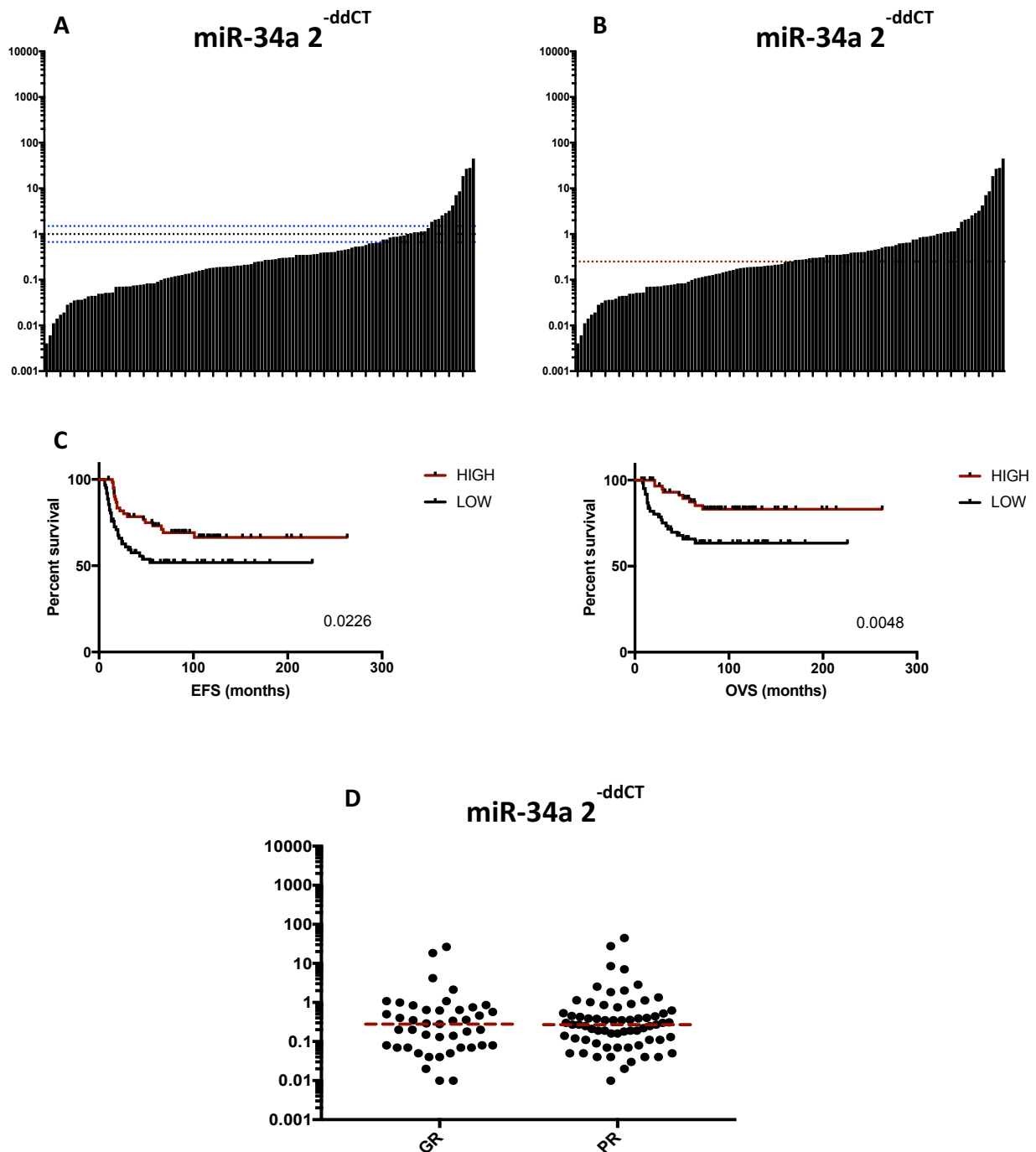


Figura 2. Espressione e valore prognostico di miR-34a in 124 pazienti affetti da sarcoma di Ewing localizzato alla diagnosi. **A-B.** Quantificazione relativa (2^{-ddCT}) rispetto al calibratore HSSC163. Il range di espressione di ± 1.5 fold increase rispetto al calibratore è evidenziato tra le linee tratteggiate in blu (A); il valore mediano dei livelli di espressione nella casistica è evidenziato con la linea tratteggiata in rosso (B). **C.** Curve di sopravvivenza calcolate per EFS ed OVS in seguito a categorizzazione dei pazienti in alto o basso-esprimenti. **D.** Espressione di miR-34a in pazienti con buona o scarsa risposta alla chemioterapia (GR, PR rispettivamente). La mediana dei livelli di espressione è evidenziata come linea tratteggiata in rosso.

1.3 LGALS3BP e miR-34a sono predittori indipendenti dell'esito clinico in analisi multivariata

Validato il valore prognostico dei livelli di espressione di miR-34a e LGALS3BP in analisi univariata, abbiamo voluto verificarne il potere predittivo indipendente rispetto alle caratteristiche clinico-patologiche che risultano correlate all'esito clinico nella nostra casistica (livelli di LDH, tipologia di controllo locale, risposta alla chemioterapia valutata come necrosi sul pezzo operatorio).

I risultati dell'analisi multivariata (Cox proportional hazards model con selezione delle covariate tramite metodo Stepwise) hanno confermato miR-34a e LGALS3BP come predittori indipendenti dell'esito clinico sia in termini di EFS che OVS (Tabella 5). Pazienti alto-esprimenti hanno un rischio di sviluppare metastasi o recidive locali ridotto rispetto a quello dei basso-esprimenti (HR=0.485 e 0.402 per miR-34a e LGALS3BP, rispettivamente). Analogamente, il rischio di decesso legato al tumore nei pazienti alto-esprimenti è ridotto rispetto a quello dei basso-esprimenti (HR=0.353 e 0.397 per miR-34a e LGALS3BP rispettivamente).

EFS	Hazard Ratio	95% CI		P value
		Lower	Upper	
LDH: elevate	2.534	1.207	5.321	0.014
Risposta alla chemioterapia: BUONA	0.351	0.157	0.788	0.011
miR-34a: HIGH	0.485	0.236	0.996	0.049
LGALS3BP: HIGH	0.402	0.190	0.850	0.017

OVS	Hazard ratio	95% CI		P value
		Lower	Upper	
LDH: elevate	4.285	1.729	10.620	0.002
Risposta alla chemioterapia: BUONA	0.291	0.104	0.815	0.019
miR-34a: HIGH	0.353	0.132	0.943	0.038
LGALS3BP: HIGH	0.397	0.159	0.993	0.048

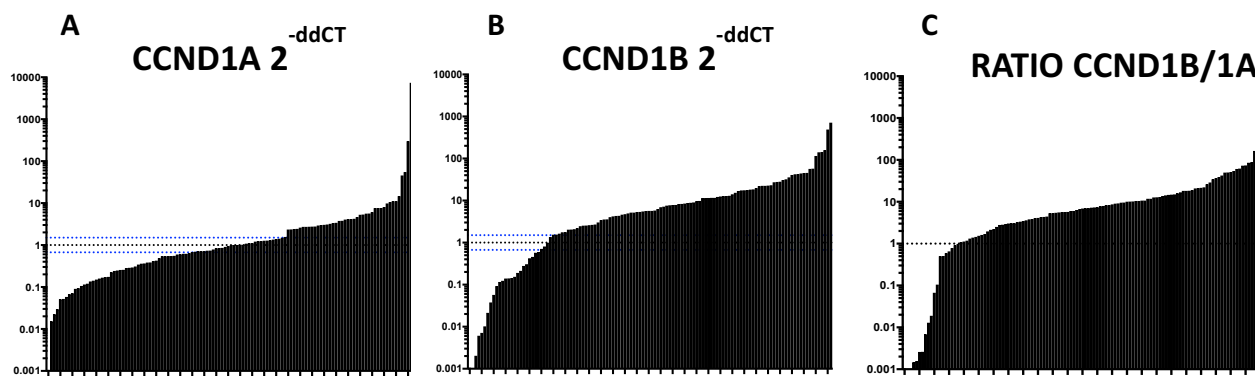
Tabella 5. Analisi multivariata del valore prognostico di LGALS3BP e miR-34a

2. Ruolo di miR-34a nel sarcoma di Ewing

2.1 miR-34a ha come bersaglio l'isoforma 1B della ciclina D1

Allo scopo di approfondire la relazione tra miR-34a ed il suo target ciclina D1, abbiamo valutato l'espressione delle due isoforme di questo gene (CCND1A, CCND1B) nella nostra casistica di riferimento. Mentre i livelli di espressione di CCND1A si sono mostrati eterogenei e distribuiti in maniera complessivamente bilanciata in un range di ± 1.5 fold increase rispetto alle cellule mesenchimali HSSC196 utilizzate come calibratore (43/122 – 35.2% pazienti over-esprimenti; 31/122 – 25.4% pazienti con livelli di espressione entro il range; 48/122 – 39.3% pazienti sottoesprimenti) (Figura 3A), CCND1B risulta over-espressa nella maggioranza dei casi (94/122 – 79.5%), sotto-espressa in un gruppo ridotto (24/122 – 19.7%), mentre solo un'esigua frazione di essi esprime questa isoforma a livelli comparabili rispetto alle mesenchimali (4/122 – 3.3%) (Figura 3B). Conseguentemente, il rapporto tra i livelli di espressione delle due isoforme è sbilanciato in favore di CCND1B nella maggioranza dei casi (97/122 – 79.5% con ratio CCND1B/CCND1A > 1) (Figura 3C).

L'analisi di correlazione tra i livelli di espressione di miR-34a e le due isoforme di CCND1 ha mostrato una correlazione inversa statisticamente significativa tra miR-34a e CCND1B (Spearman $R = -0.246$, $p = 0.006$) ma non CCND1A (Figura 3D), suggerendo che miR-34a abbia come target specifico l'isoforma 1B.



D

	CCND1A 2-ddCT	CCND1B 2-ddCT	RATIO CCND1B/1A	
miR34a 2-ddCT	-0.031	-0.246	-0.185	R
	0.732	0.006	0.042	p
	122	122	122	n

Figura 3. Espressione delle isoforme di CCND1 in 122 pazienti affetti da sarcoma di Ewing localizzato alla diagnosi e correlazione con i livelli di espressione di miR-34a. A-B. Quantificazione relativa (2^{-ddCT}) rispetto al calibratore HSSC196 dei livelli di espressione di CCND1A (A) e CCND1B (B). Il range di espressione di ± 1.5 fold increase rispetto al calibratore è evidenziato tra le linee tratteggiate in blu. C. Rapporto tra i valori di espressione (2^{-ddCT}) delle due isoforme. D. Correlazione dei livelli di espressione di miR-34a con le isoforme di CCND1 (Spearman Correlation).

2.2 Un modello cellulare di over-espressione stabile conferma il ruolo oncosoppressore di miR-34a nel sarcoma di Ewing in vitro ed in vivo

Sfruttando un sistema commerciale basato su vettori lentivirali, la linea cellulare di sarcoma di Ewing A673 è stata trasdotta con un costrutto codificante miR-34a e GFP in un unico trascritto policistronico. La popolazione bulk così ottenuta è stata successivamente seminata in condizioni di diluizione limitante per l'ottenimento di singoli cloni. A seguito di un pre-screening effettuato su 43 cloni per l'espressione di GFP (range 42.7-99.82% di positività), 10 tra quelli con %GFP > 90% (Figura 4 A-B) sono stati selezionati per la verifica dell'espressione di miR-34a tramite PCR realtime. L'over-espressione di miR-34a rispetto al controllo trasdotto con vettore vuoto è stata confermata per tutti i cloni analizzati, con livelli aumentati di almeno 300 volte in 8/10 di essi (Figura 4C). La scelta di un sistema di espressione basato su vettori lentivirali è basata sulla necessità di avere cellule che over-esprimessero miR-34a in maniera stabile anche al di fuori del terreno di selezione, soprattutto in vista del possibile utilizzo in vivo di questo modello. Nel nostro sistema, i livelli di espressione di miR-34a si sono mostrati stabili in cloni mantenuti in coltura in IMDM senza Zeocina fino a 4 passaggi, sia in termini di comparabilità rispetto alla controparte mantenuta in terreno di selezione, che in termini di over-espressione rispetto al controllo trasdotto con vettore vuoto (Figura 4D).

In questo modello sono successivamente stati valutati gli effetti dell'over-espressione di miR-34a su parametri di malignità in vitro quali capacità di crescita in monostrato o in condizioni di ancoraggio-indipendenza e sensibilità a farmaci chemioterapici. I cloni over-esprimenti miR-34a mostrano una ridotta capacità proliferativa ed un aumento del tempo di raddoppiamento (Figura 5 A-B) rispetto ai controlli. La formazione di colonie in soft agar è risultata significativamente ridotta in 3/5 cloni analizzati; oltre ad essere ridotte in numero, le colonie prodotte si mostrano più piccole rispetto a quelle prodotte dai controlli (Figura 5C). In seguito ad esposizione per 72h a Doxorubicina (DXR) e Vincristina (VCR), due tra i chemioterapici più comunemente utilizzati nella terapia del sarcoma di Ewing, i cloni over-esprimenti miR-34a mostrano un'aumentata sensibilità, che si riflette in un aumento della IC50 rispetto ai controlli (Figura 5D).

Allo scopo di verificare l'eventuale dose-dipendenza nel fenotipo osservato in vitro rispetto ai livelli di espressione di miR-34a, è stata effettuata un'analisi di correlazione tra questi livelli ed i parametri di malignità investigati (Tabella 6). Sebbene la correlazione risulti statisticamente significativa solo per la sensibilità alla Doxorubicina, è interessante notare come i coefficienti di correlazione siano elevati (>0.5) per tutte le caratteristiche fenotipiche analizzate; è possibile dunque che la limitata dimensione del campione impedisca di evidenziare una significatività statistica.

Il ruolo oncosoppressore di miR-34a è stato successivamente valutato in un setting *in vivo*, tramite iniezione s.c. dei cloni #11 e #39 in topi NSG. In un periodo di osservazione di 25 giorni, il clone #39 non ha dato origine a tumori misurabili negli ospiti; il clone #11 ha generato tumori in 5/5 topi iniettati, sebbene con latenza leggermente aumentata e volume tumorale significativamente ridotto rispetto ai controlli (Figura 6). Questi risultati mostrano come l'over-espressione di miR-34a determini una riduzione del potenziale oncogenico *in vivo*.

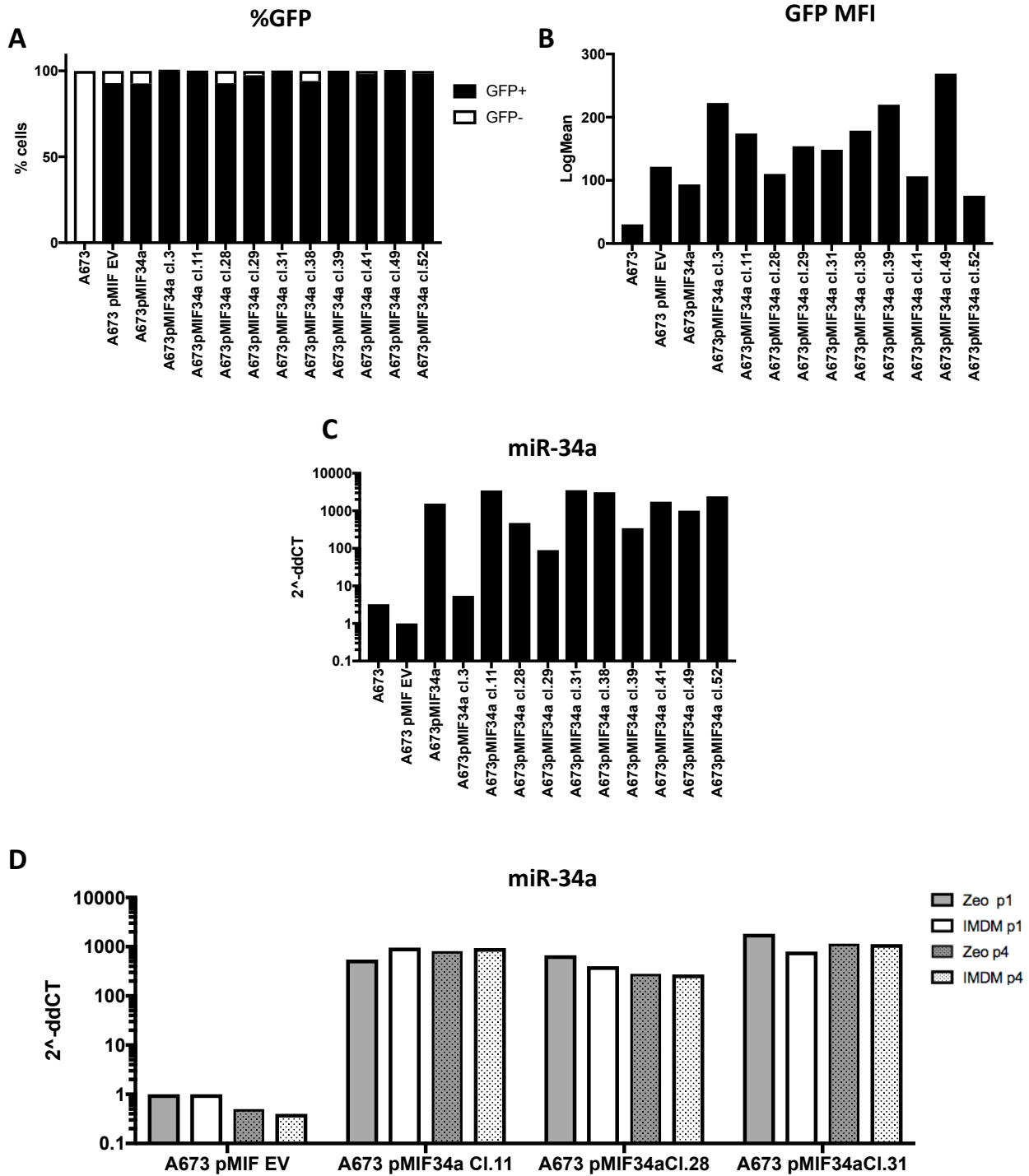


Figura 4. Screening dei cloni A673 trasdotti con vettore lentivirale p-MIF-miR-34a. **A-B.** Analisi FACS per la determinazione della percentuale di cellule trasdotte. **C.** Verifica dell'over-espressione di miR-34a tramite PCR Realtime. Dati normalizzati rispetto a controllo trasdotto con vettore vuoto. **D.** Verifica della stabilità dell'over-espressione di miR-34a fino a 4 passaggi (p4) rispetto al giorno della semina (p1), in terreno di selezione (Zeo) o normale (IMDM). Dati normalizzati rispetto al controllo trasdotto con vettore vuoto al giorno della semina.

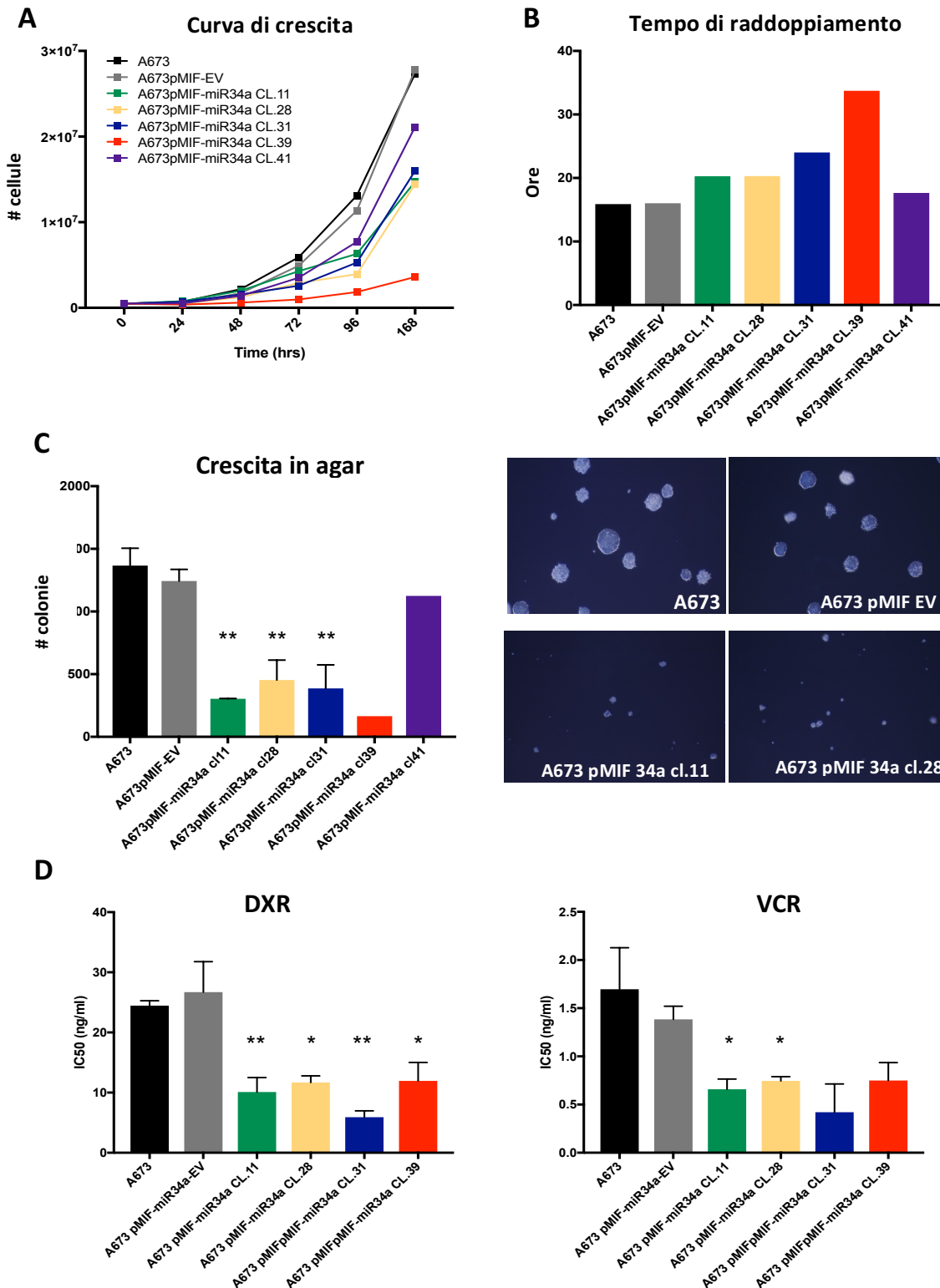


Figura 5. Caratterizzazione in vitro dei cloni A673 over-esprimenti miR-34a. A-B. Effetto dell'over-espressione di miR-34a sulla capacità proliferativa in monostrato. C. Effetto dell'over-espressione di miR-34a sulla capacità di formare colonie in terreno semisolido (** $p < 0.01$, Unpaired T test). Sulla destra, foto rappresentative delle colonie ottenute dai cloni #11 e #28 in confronto ai controlli A673 (non trasdotto) e A673 trasdotto con vettore vuoto. D. Effetto dell'over-espressione di miR-34a sulla sensibilità ai chemioterapici Doxorubicina (DXR) e Vincristina (VCR) (** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ Unpaired T test)

Correlazione di Spearman	
miR-34a 2 ^{-ddCT}	
R	p
Tempo di raddoppiamento	0.500
# Colonie	-0.536
IC50 DXR	-1.000
IC50 VCR	-0.600
	0.267
	0.236
	0.003
	0.242

Tabella 6. Correlazione di Spearman tra espressione di miR-34a e parametri di malignità in vitro.

A

	Incidence	Latency (days)
A673	5/5 (100%)	8 ± 0
A673 pMIF-EV	5/5 (100%)	8 ± 0
A673 pMIF-miR34a cl.11	5/5 (100%)	9,2 ± 2,7
A673 pMIF miR34a cl.39	0/5 (0%)*	47,6 ± 4,2

B

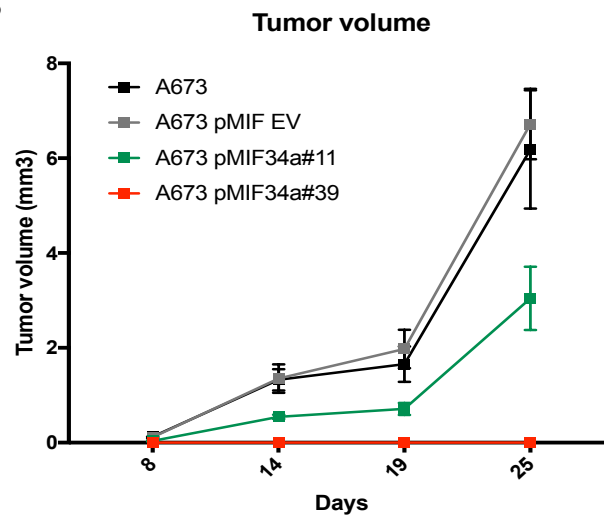


Figura 6. Caratterizzazione in vitro dei cloni A673 over-esprimenti miR-34a. **A.** Dati di latenza e incidenza tumorale in seguito ad iniezione s.c. di 2×10^6 cellule. **B.** Volume tumorale misurato in un periodo di osservazione di 25 giorni.

3. Studio esplorativo del valore predittivo dei livelli di miR-34a circolante

Nell'ambito del progetto PROVABES per la validazione prospettica di biomarker nel sarcoma di Ewing, abbiamo avuto accesso a campioni di plasma ottenuti da 12 pazienti arruolati presso l'Istituto Ortopedico Rizzoli di Bologna (Tabella 7). I prelievi sono stati effettuati a diverse tempistiche: prima dell'inizio del trattamento (A_basale), al termine della chemioterapia somministrata ai pazienti prima del controllo locale (B_post-ctx & pre-trattamento locale), al termine della chemioterapia somministrata in seguito al controllo locale (C_post-ctx post-trattamento locale), e a 12 mesi dall'inizio del trattamento (D_15mo post basale). Su questi campioni è stata effettuata la valutazione dei livelli di miR-34a circolante tramite qRT-PCR.

Un primo sguardo d'insieme mostra come i livelli di miR-34a circolante siano eterogenei nei 12 pazienti analizzati alle diverse tempistiche, ma significativamente più elevati rispetto ai controlli sani (HD) alla baseline e prima del controllo locale (Figura 7A). Poiché nel sarcoma di Ewing l'evoluzione della malattia è fortemente influenzata dallo stato di disseminazione al momento della diagnosi, ci siamo chiesti se questo si riflettesse nel profilo dei livelli di miR-34a circolante. Osservando separatamente pazienti localizzati o metastatici alla diagnosi, solo questi ultimi si presentano con livelli baseline significativamente più elevati, mentre entrambe le categorie mostrano livelli significativamente più elevati rispetto ai controlli in seguito a chemioterapia preparatoria (Figura 7B). Ci siamo inoltre chiesti se il profilo dei livelli di miR-34a circolante nel tempo potesse essere influenzato dal tipo di controllo locale applicato (chirurgia o radioterapia). Mentre i livelli dei pazienti sottoposti a radioterapia si mostrano eterogenei nei diversi timepoint, quelli dei pazienti sottoposti a chirurgia sembrano meno variabili, e generalmente più elevati rispetto a quelli dei controlli sani (Figura 7C). Non sono state rilevate differenze significative nei livelli circolanti di miR-34a ai diversi timepoint nel confronto tra pazienti con malattia localizzata vs diffusa alla diagnosi, o nel confronto tra pazienti sottoposti a chirurgia o radioterapia, con l'eccezione di livelli di miR-34a più elevati al termine della chemioterapia pre-operatoria nel gruppo trattato con chirurgia (Figura 7D).

CARATTERISTICHE PAZIENTI						CAMPIONI DI PLASMA PER QUANTIFICAZIONE miR34a			
CODICE	GENERE	ETA'	SEDE	LOCALIZZATO/ METASTATICO	TRATTAMENTO LOCALE	BASALE (A)	POST-CTX / PRE- TRATTAMENTO LOCALE (B)	POST-CTX / POST- TRATTAMENTO LOCALE (C)	15 MESI POST BASALE (D)
1	M	33	D6	LOC	RXT				
2	F	17	TIBIA	MET	RXT				
3	M	19	L1	LOC	RXT				
4	M	13	TIBIA	MET	CHIRURGIA				
5	M	14	TIBIA	LOC	CHIRURGIA				
6	F	58	SCAPOLA	MET	RXT				
7	F	23	FEMORE	LOC	CHIRURGIA				
8	M	14	TIBIA	MET	RXT				
9	M	12	FEMORE	MET	RXT				
10	M	11	FEMORE	LOC	CHIRURGIA				
11	M	12	TIBIA	LOC	CHIRURGIA				
12	M	16	FEMORE	LOC	CHIRURGIA				

Tabella 7. Riassunto caratteristiche pazienti PROVABES e schema campioni plasma analizzati

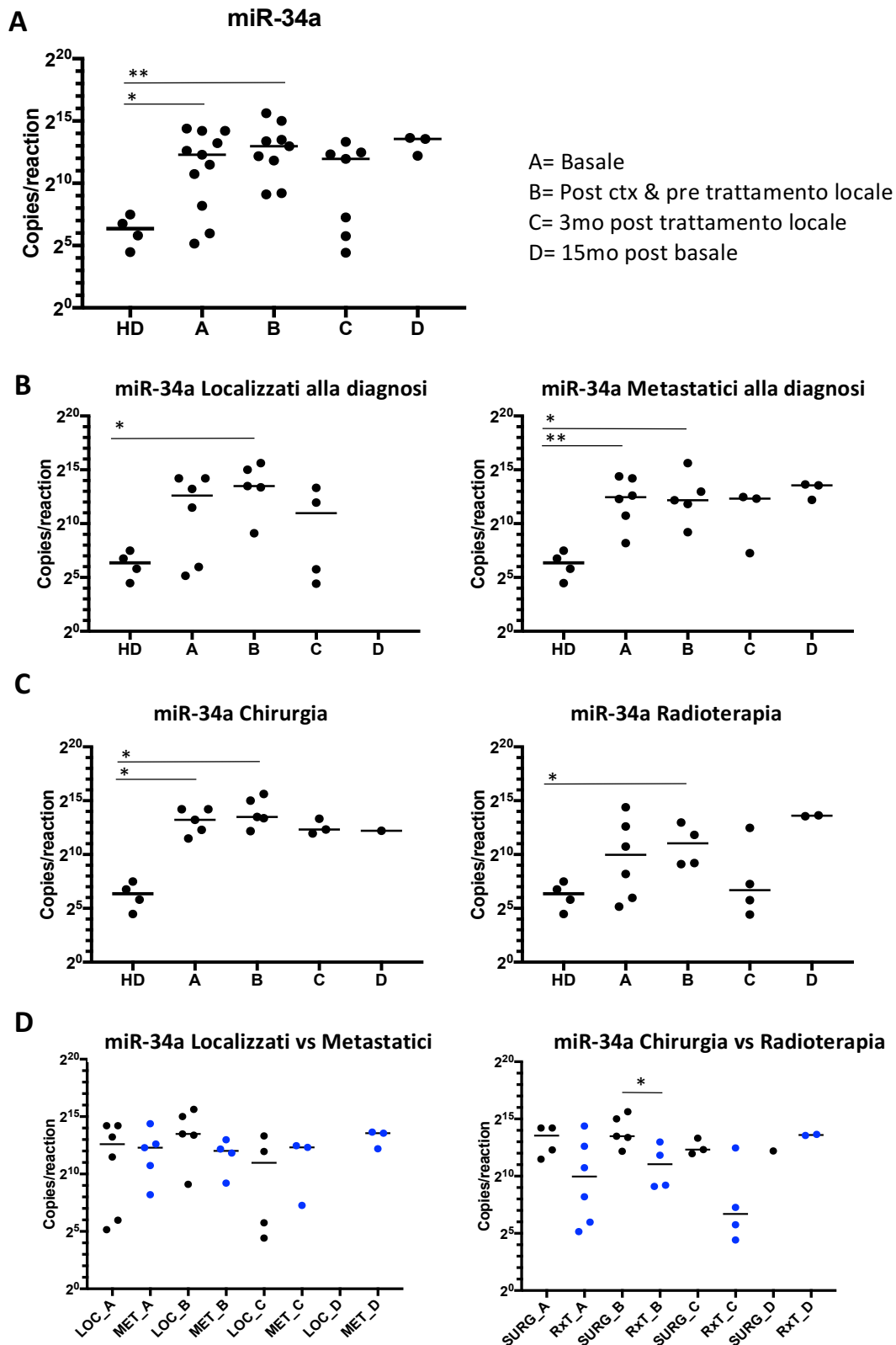


Figura 7. Quantificazione miR-34a circolante tramite qRT-PCR. Il numero di copie di miR-34a per reazione sono rappresentati per i 12 pazienti inclusi nello studio PROVABES nel loro complesso (A), suddivisi in base allo stato di disseminazione della malattia alla diagnosi (B), o in base al tipo di intervento di controllo locale ricevuto (C). Il pannello D mostra il confronto dei livelli di miR-34a circolante tra pazienti categorizzati come in B e C ai diversi timepoint. I grafici riportano la mediana dei valori di espressione. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ Mann-Whitney test.

4. Identificazione di potenziali nuovi biomarker associati alla risposta alla chemioterapia

Allo scopo di identificare caratteristiche molecolari del sarcoma di Ewing in grado di predire la risposta alla chemioterapia, abbiamo analizzato tramite whole transcriptome sequencing 15 biopsie selezionate in base alla risposta differenziale dei pazienti al trattamento chemioterapico: 8 biopsie provengono da pazienti che hanno mostrato una buona risposta (GR, liberi da malattia ad almeno 6 anni di follow up) e 7 biopsie ottenute da pazienti che hanno mostrato scarsa risposta (PR, ricaduti generalmente durante il trattamento stesso). I pazienti sono stati trattati presso l'Istituto Ortopedico Rizzoli tra il 1991 ed il 2006 (13/15 tra il 2002 e il 2006, 1/15 nel 1991 ed 1/15 nel 1997, entrambi PR). La sopravvivenza media è 115 mesi (range 88-137) per i GR, e 32 mesi (range 4-89) per i PR (Tabella 8). La percentuale di pazienti liberi da malattia all'ultimo follow-up è 100% e 12.5% per GR e PR rispettivamente. Un paziente del gruppo PR è libero da malattia all'ultimo follow up; si tratta di un paziente che non ha risposto alla prima linea di trattamento, e per il quale il protocollo terapeutico è stato successivamente modificato. Le caratteristiche su cui ci si è focalizzati in fase di analisi dei dati di sequenziamento sono state l'identificazione di trascritti di fusione (sia appartenenti alla famiglia EW-ETS che potenziali prodotti di traslocazioni non precedentemente descritte) e di SNV ricorrenti nei diversi campioni e con frequenza differenziale in GR versus PR, così come l'identificazione di lincRNAs con livelli di espressione differenziali nei due gruppi di pazienti.

Caratteristiche	Casi RNA-seq						Casi Sanger	
	All Patients N. 15	%	GR. N.	%	PR. N.	%	30 cases n.	%
Genere								
Femmina	8	53.3	5	62.5	3	42.9	12	40.0
Maschio	7	46.7	3	37.5	4	57.1	18	60.0
Età								
≤ 14 anni	6	40.0	4	50.0	2	28.6	10	33.4
> 14 anni	9	60.0	4	50.0	5	71.4	20	66.6
Status alla diagnosi								
Localizzato	14	93.3	8	100.0	6	85.7	17	56.7
Metastatico	1	6.7	0	0.0	1	14.3	13	43.3
Tipo di tessuto								
Biopsia	15	100.0	8	100.0	7	100.0	11	36.7
Resezione/Amputazione	0	0.0	0	0.0	0	0.0	18	60.0
Recidiva	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	3.3
Sede								
Estremità	11	73.3	4	50.0	7	100.0	20	66.6
Centrale	0	0.0	0	0.0	0	0.0	5	16.7
Pelvi	4	26.7	4	50.0	0	0.0	5	16.7
LDH								
Normali	6	40.0	4	50.0	2	50.0	6	60.0
Elevate	6	40.0	4	50.0	2	50.0	4	40.0
Chirurgia								
SI	12	80.0	7	87.5	5	71.4	23	76.7
NO	3	20.0	1	12.5	2	28.6	7	23.3
Trattamento locale								
RxT	3	20.0	1	12.5	2	28.6	7	23.3
RxT+Chirurgia	3	20.0	1	12.5	2	28.6	8	26.7
Chirurgia	9	60.0	6	75.0	3	42.9	15	50.0
Protocollo chemioterapia								
ISG/SSG III-IV	13	86.7	8	100.0	5	71.4	20	87.0
altri	2	13.3	0	0.0	2	28.6	3	13.0
Risposta alla chemioterapia								
Buona (GR)	8	53.3	8	100.0	0	0.0	2	16.7
Scarsa (PR)	7	46.7	0	0.0	7	100.0	10	83.3
Tipo di traslocazione								
EWS/Fli-1 Tipo I	5	33.3	4	50.0	1	14.3	12	66.7
EWS/Fli-1 non-Tipo I	9	60.0	3	37.5	6	85.7	6	33.3
EWS/ERG	1	6.7	1	12.5	0	0.0	0	0.0
EFS (Status)								
NED	9	60.0	8	100.0	1	14.3	5	16.7
REL	6	40.0	0	0.0	6	85.7	24	80.0
LOST	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	3.3
OVS (Status)								
Alive	9	60.0	8	100.0	1	14.3	8	26.7
Dead	6	40.0	0	0.0	6	85.7	21	70.0
Lost	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	3.3
Sopravvivenza								
EFS (range)	72 (0-137)		115 (88-137)		23 (0-89)		22 (0-165)	
OVS (range)	76 (4-137)		115 (88-137)		32 (4-89)		48 (4-165)	

Tabella 8. Caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti Ewing inclusi nello studio di RNAseq e nella ricerca/validazione di mutazioni a carico di TP53 (Sanger cases)

4.1 I trascritti EWSR1-ETS sono gli unici trascritti di fusione ricorrenti nel nostro gruppo di pazienti

L'analisi del trascrittoma per la presenza di trascritti di fusione ha evidenziato trascritti EWS-ETS in 14/15 pazienti analizzati (Tabella 9). È stato possibile validare il dato tramite PCR classica in 13/15 pazienti (per 2/15 il cDNA di partenza è risultato di qualità insufficiente al momento dell'analisi). Abbiamo osservato concordanza di risultati tra RNAseq e PCR in 11/13 casi (84.6%); i due casi discordanti includono: 1 trascritto EWS-FLI1 Tipo2 non detectato dall'RNAseq ma confermato in PCR classica, 1 trascritto di fusione classificato come EWS-FLI1 Tipo4 dall'RNAseq risultato EWS-FLI1 Tipo1 in PCR classica. In termini di frequenza relativa dei trascritti di fusione, la nostra popolazione di studio si mostra più eterogenea di quanto generalmente descritto nel sarcoma di Ewing, in cui EWS-FLI1 Tipo1 è il trascritto più frequente (Tabella 10). È stata inoltre effettuata una ricerca di possibili trascritti di fusione alternativi non precedentemente descritti nel sarcoma di Ewing. L'unico elemento ricorrente nel nostro gruppo di pazienti è risultata essere una putativa traslocazione intracromosomica che coinvolge i geni NAIP (NLR family Apoptosis Inhibitor Proteins) e OCN (Occludin) (Tabella 11). Entrambi i geni si trovano nella regione Chr5q13.2, ricca di geni e di elementi ripetitivi che rendono difficile l'interpretazione della reale organizzazione della regione tramite dati di sequencing, portandoci ad interpretare i risultati ottenuti come un artefatto dovuto alla complessità della regione interessata.

Risposta alla chemioterapia	Library ID	EWS/FLI1 (esoni)	Tipo di fusione	RNA-seq scores	PCR	Concordanza RNAseq / PCR
GR	L95	7-5	Tipo 2	3, 2	Tipo 2	SI
	L87	7-6	Tipo 1	42, 18, 14	Tipo 1	SI
	L80	10-6	Tipo 3	70, 30, 35	Degraded	--
	L88	10-5	Tipo 4	67, 18, 35	Not Tipo 1, not Tipo 2	SI
	L96	7-6	Tipo 1	24, 13, 4	Tipo 1	SI
	L89	EWS/ERG 7-6	EWS/ERG	13, 7, 3	EWS/ERG	SI
	L97	10-5	Tipo 4	3, 3	Tipo 1	NO
	L90	7-6	Tipo 1	8, 7	Tipo 1	SI
PR	L91	7-5	Tipo 2	4, 4	Tipo 2	SI
	L84	10-6	Tipo 3	60, 29, 21	Not Tipo 1, not Tipo 2	SI
	L92	10-5	Tipo 4	7, 9	Degraded	--
	L85	7-5	Tipo 2	6, 8	Tipo 2	SI
	L93	7-6	Tipo 1	59, 22, 25	Tipo 1	SI
	L86	7-5	Tipo 2	8, 5	Tipo 2	SI
	L94	Non detectato	Non detectato	--	Tipo 2	NO

Tabella 9. Trascritti di fusione rilevati tramite RNAseq e risultati validazione tramite PCR classica.

Tipo di fusione	Presente studio		Studi precedenti
	n	%	%
EWS/Fli-1 Tipo 1	4	26.7	67.8*
EWS/Fli-1 Tipo 2	5	33.3	25.9*
EWS/Fli-1 Tipo 3	2	13.3	2*
EWS/Fli-1 Tipo 4	3	20.0	3*
EWS-ERG	1	6.7	5-10**

Tabella 10. Frequenza dei diversi trascritti di fusione e confronto con frequenze riportate in letteratura.

*(Gamberi et al., 2011) **(Pinto et al., 2011)

ID	Risposta alla chemioterapia	Breakpoint region (esoni)	N. programmi di predizione	Score predizione
L87	GR	13-5	2	34, 158
L85	PR	16-5	3	5, 11, 14
L93	PR	13-5	3	1, 37, 166

Tabella 11. Dettagli relativi al putativo trascritto di fusione NAIP/OCN

4.2 Mutazioni a carico di TP53 si presentano con frequenza differenziale in pazienti con buona o scarsa risposta alla chemioterapia.

L'analisi bioinformatica per la ricerca di SNVs, ha restituito una lista di 87 geni colpiti da SNV ricorrenti in almeno 2 pazienti (Tabella 12), 59 dei quali presentano SNV multipli. Restringendo l'analisi a geni colpiti da SNV predetti come deleteri sulla funzionalità del gene, ne abbiamo identificati 42 colpiti da almeno 1 SNV deleterio, e 14 colpiti unicamente da SNV predetti come deleteri (Tabella 13). In questo contesto, sono state identificate 3 diverse mutazioni a carico del gene TP53 che si presentano con frequenza differenziale in PR (4/7 pazienti con mutazione) e GR (0/8 pazienti mutati). Le mutazioni a carico di p53 non sono silenti e coinvolgono gli esoni centrali 6, 7, 8, portando all'introduzione di un codone di stop in posizione R213X e a due mutazioni missenso, R273C e R248W (Tabella 14).

Le mutazioni riscontrate tramite NGS sono state successivamente verificate con metodo Sanger su 10 campioni di cui era disponibile DNA genomico, confermando la presenza delle mutazioni nei 4 campioni identificati tramite RNAseq, ed identificandone uno nuovo, L92, con mutazione in posizione p.R273C. Per 11/15 dei pazienti analizzati era disponibile DNA proveniente da tessuto non tumorale (muscolo sano o linfociti), ed è stato quindi possibile indagare l'origine (somatica o germline) delle mutazioni identificate, che è risultata somatica in tutti i casi analizzati (Tabella 15).

Questi risultati preliminari ci hanno spinti ad estendere la ricerca di mutazioni a carico dell'intero gene TP53 in una casistica estesa a 30 pazienti con sarcoma di Ewing (Tabella 8, 'Sanger cases'). Questo approccio oltre a confermare la presenza della mutazione c.817C>T; p.R273C in un paziente in comune con la casistica RNAseq, ha identificato 1 mutazione non rilevata nel precedente studio: c.1157A>T; p.K386M, mutazione de novo (Tabella 16).

Considerando nell'insieme i casi analizzati (RNAseq + Sanger cases), la frequenza di mutazioni a carico di TP53 è di 6/44 (13.6%). 5/6 pazienti con TP53 mutato al momento della diagnosi sono ricaduti durante il trattamento, e in tempi più rapidi rispetto ai pazienti ricaduti ma che hanno p53 wt (Figura 8).

GENE	GeneDescription	Ricorrenze totali	SNV multipli	Ricorrenze deleterie	Ricorrenze neutrali	Ricorrenze deleterie nei PR	Ricorrenze deleterie nei GR	Ricorrenze neutrali nei PR	Ricorrenze neutrali nei GR
ZP3	Zona pellucida glycoprotein 3 (sperm receptor)	8	SI	0	8	0	0	3	5
PDE4DIP	Phosphodiesterase 4D interacting protein (myomegalin)	6	SI	6	0	2	4	0	0
FRG1	FSHD region gene 1	6	SI	5	1	3	2	1	0
FAM21C	Family with sequence similarity 21, member C	6	SI	3	3	1	2	1	2
PRCP	Prolylcarboxypeptidase (angiotensinase C)	5	SI	5	0	3	2	0	0
EEF1D	Eukaryotic translation elongation factor 1 delta (guanine nucleotide exchange protein)	5	SI	4	1	3	1	0	1
KANSL1	KAT8 regulatory NSL complex subunit 1	5	SI	4	1	1	3	1	0
CDH23	Cadherin-like 23	5	SI	2	3	2	0	0	3
ANKRD11	Ankyrin repeat domain 11	5	SI	0	5	0	0	2	3
TP53	Tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)	4	SI	4	0	4	0	0	0
HERC2	Hect domain and RLD 2	4	SI	4	0	2	2	0	0
JMJD8	jumonji domain containing 8	4	SI	4	0	2	2	0	0
SRRM2	Serine/arginine repetitive matrix 2	4	SI	4	0	1	3	0	0
AKAP8	A kinase (PRKA) anchor protein 8	4	SI	3	1	1	2	1	0
COG3	Component of oligomeric golgi complex 3	4	SI	1	3	0	1	2	1
MRPL45	Mitochondrial ribosomal protein L45	4	SI	1	3	0	1	2	1
CRIPAK	Cysteine-rich PAK1 inhibitor	4	SI	0	4	0	0	1	3
GPANK1	G patch domain and ankyrin repeats 1	4	SI	0	4	0	0	2	2
SIRPA	Signal-regulatory protein alpha	4	SI	0	4	0	0	1	3
WASH1	WAS protein family homolog 1	4	SI	0	4	0	0	2	2
LIG1	Ligase I, DNA, ATP-dependent	3	SI	3	0	2	1	0	0
AAAS	Achalasia, adrenocortical insufficiency, alacrimia (Allgrove, triple-A)	3	SI	3	0	2	1	0	0
ABHD16A	abhydrolase domain containing 16A	3	SI	3	0	1	2	0	0
KPNA2	Karyopherin alpha 2 (RAG cohort 1, importin alpha 1)	3	SI	3	0	2	1	0	0
MAN2C1	Mannosidase, alpha, class 2C, member 1	3	SI	3	0	2	1	0	0
NARG2	NMDA receptor regulated 2	3	SI	3	0	1	2	0	0
NOMO1	NODAL modulator 1	3	SI	3	0	0	3	0	0
REXO1	REX1, RNA exonuclease 1 homolog (S. cerevisiae)	3	SI	3	0	2	1	0	0

MYBBP1A	MYB binding protein (P160) 1a	3	SI	2	1	1	1	0	1
CENPT	Centromere protein T	3	SI	2	1	0	2	1	0
OGG1	8-oxoguanine DNA glycosylase	3	SI	2	1	0	2	0	1
RPL17	Ribosomal protein L17	3	SI	2	1	0	2	1	0
UBXN11	UBX domain protein 11	3	SI	2	1	1	1	1	0
UTRN	Utrophin	3	SI	2	1	2	0	1	0
ZC3H13	Zinc finger CCCH-Tipo containing 13	3	SI	2	1	0	2	1	0
AGRN	Agrin	3	SI	1	2	0	1	1	1
CDK13	cyclin-dependent kinase 13	3	SI	1	2	1	0	1	1
C9orf86	Chromosome 9 open reading frame 86	3	SI	1	2	1	0	1	1
COL12A1	Collagen, Tipo XII, alpha 1	3	SI	1	2	1	0	1	1
DPP7	Dipeptidyl-peptidase 7	3	SI	1	2	0	1	0	2
FLNB	Filamin B, beta (actin binding protein 278)	3	SI	1	2	1	0	2	0
KIFC2	Kinesin family member C2	3	SI	1	2	1	0	2	0
PDCL3	Phosducin-like 3	3	SI	1	2	0	1	1	1
SBF1	SET binding factor 1	3	SI	1	2	0	1	0	2
GMPPB	GDP-mannose pyrophosphorylase B	3	SI	0	3	0	0	1	2
ADAMTS4	ADAM metalloproteinase with thrombospondin Tipo 1 motif, 4	3	SI	0	3	0	0	2	1
CCDC74B	Coiled-coil domain containing 74B	3	SI	0	3	0	0	3	0
IGF2R	Insulin-like growth factor 2 receptor	3	SI	0	3	0	0	1	2
MICB	MHC class I polypeptide-related sequence B	3	SI	0	3	0	0	0	3
NUP153	Nucleoporin 153kDa	3	SI	0	3	0	0	0	3
PIEZO1	Piezo-Tipo Mechanosensitive Ion Channel Component 1	3	SI	0	3	0	0	0	3
SCNN1D	Sodium channel, nonvoltage-gated 1, delta	3	SI	0	3	0	0	1	2
SON	SON DNA binding protein	3	SI	0	3	0	0	2	1
SPG11	Spastic paraplegia 11 (autosomal recessive)	3	SI	0	3	0	0	1	2
CDKN1B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)	2	SI	1	1	1	0	1	0
EPN1	Epsin 1	2	SI	1	1	0	1	0	1
ATP13A1	ATPase Tipo 13A1	2	SI	1	1	1	0	0	1
GOLGA8A	Golgi autoantigen, golgin subfamily a, 8A	2	SI	1	1	1	0	1	0
POLRMT	Polymerase (RNA) mitochondrial (DNA directed)	2	SI	0	2	0	0	1	1
SRGN	Serglycin	15	no	0	15	0	0	7	8

C2orf76	chromosome 2 open reading frame 76	14	no	0	14	0	0	7	7
IGFBP7	Insulin-like growth factor binding protein 7	14	no	0	14	0	0	6	8
FYTTD1	Forty-two-three domain containing 1	13	no	13	0	6	7	0	0
RBMXL1	RNA binding motif protein, X-linked-like 1	10	no	0	10	0	0	5	5
ACP1	Acid phosphatase 1, soluble	8	no	0	8	0	0	3	5
CBWD6	COBW domain containing 6	8	no	0	8	0	0	4	4
NEIL1	Nei endonuclease VIII-like 1 (E. coli)	8	no	0	8	0	0	2	6
COPA	Coatmer protein complex, subunit alpha	7	no	7	0	3	4	0	0
CRIP1	Cysteine-rich protein 1 (intestinal)	7	no	7	0	4	3	0	0
PDLIM1	PDZ and LIM domain 1 (elfin)	7	no	0	7	0	0	3	4
GCSH	Glycine cleavage system protein H (aminomethyl carrier)	6	no	0	6	0	0	2	4
MDH2	Malate dehydrogenase 2, NAD (mitochondrial)	6	no	0	6	0	0	3	3
BMP8A	Bone morphogenetic protein 8a	5	no	0	5	0	0	2	3
CLEC18B	C-Tipo lectin domain family 18, member B	5	no	0	5	0	0	1	4
TRIM16	Tripartite motif-containing 16	5	no	0	5	0	0	1	4
CCZ1	CCZ1 vacuolar protein trafficking and biogenesis associated homolog (S. cerevisiae)	4	no	0	4	0	0	2	2
CDK11B	cyclin-dependent kinase 11B	4	no	0	4	0	0	2	2
NCF1	Neutrophil cytosolic factor 1, (chronic granulomatous disease, autosomal 1)	4	no	0	4	0	0	2	2
PDCD6IP	Programmed cell death 6 interacting protein	4	no	0	4	0	0	2	2
ACAA1	Acetyl-Coenzyme A acyltransferase 1 (peroxisomal 3-oxoacyl-Coenzyme A thiolase)	3	no	3	0	1	2	0	0
NOTCH2NL	Notch homolog 2 (Drosophila) N-terminal like	3	no	3	0	2	1	0	0
RPS17L	ribosomal protein S17-like	3	no	3	0	1	2	0	0
CSNK2A1P	Casein kinase 2, alpha 1 polypeptide pseudogene	3	no	0	3	0	0	2	1
LOC554223	Hypothetical LOC554223	3	no	0	3	0	0	3	0
LRRC37A	Leucine rich repeat containing 37A	3	no	0	3	0	0	0	3
PSPC1	Paraspeckle component 1	3	no	0	3	0	0	2	1
WWOX	WW domain containing oxidoreductase	3	no	0	3	0	0	2	1

Tabella 12. Lista degli 87 SNVs ricorrenti (presenti in almeno 2 pazienti) identificati tramite RNAseq in un gruppo di 15 biopsie ottenute da pazienti affetti da sarcoma di Ewing. Per ciascun gene colpito da SNV è riportato il numero delle ricorrenze e l'effetto (deleterio o neutrale) sulla funzione genica, nel totale dei 15 pazienti analizzati e nei sottogruppi PR e GR

GENE	GeneDescription	Ricorrenze totali	SNV multipli	Ricorrenze deleterie	Ricorrenze neutrali	Ricorrenze deleterie nei PR	Ricorrenze deleterie nei GR	Ricorrenze neutrali nei PR	Ricorrenze neutrali nei GR
PDE4DIP	Phosphodiesterase 4D interacting protein (myomegalin)	6	SI	6	0	2	4	0	0
PRCP	Prolylcarboxypeptidase (angiotensinase C)	5	SI	5	0	3	2	0	0
TP53	Tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)	4	SI	4	0	4	0	0	0
HERC2	Hect domain and RLD 2	4	SI	4	0	2	2	0	0
JMJD8	jumonji domain containing 8	4	SI	4	0	2	2	0	0
SRRM2	Serine/arginine repetitive matrix 2	4	SI	4	0	1	3	0	0
LIG1	Ligase I, DNA, ATP-dependent	3	SI	3	0	2	1	0	0
AAAS	Achalasia, adrenocortical insufficiency, alacrimia (Allgrove, triple-A)	3	SI	3	0	2	1	0	0
ABHD16A	abhydrolase domain containing 16A	3	SI	3	0	1	2	0	0
KPNA2	Karyopherin alpha 2 (RAG cohort 1, importin alpha 1)	3	SI	3	0	2	1	0	0
MAN2C1	Mannosidase, alpha, class 2C, member 1	3	SI	3	0	2	1	0	0
NARG2	NMDA receptor regulated 2	3	SI	3	0	1	2	0	0
NOMO1	NODAL modulator 1	3	SI	3	0	0	3	0	0
REXO1	REX1, RNA exonuclease 1 homolog (S. cerevisiae)	3	SI	3	0	2	1	0	0

Tabella 13. Lista dei geni colpiti da SNV ricorrenti (presenti in almeno 2 pazienti), multipli (almeno 2 diversi SNV rilevati), e con effetto predetto come deleterio sulla funzione genica. Per ciascun gene è riportata la frequenza nel totale di 15 campioni sottoposti ad RNAseq e le frequenze nei gruppi PR e GR

ID	Prognosi	cDNA	Esone	Reads Mutate (%)	Aa	Effetto	PROVEAN	SIFT	Effetto predetto su Aa	dbSNP ID	Cosmic ID
L91	PR	c.C637T	6	18	p.R213X	Nonsense	NA	NA	/	Not found	cosm10654
L84	PR	c.C817T	8	94	p.R273C	Missense	Deleterious	Deleterious	pathogenic	rs121913343	cosm10659
L86	PR	c.C817T	8	14	p.R273C	Missense	Deleterious	Deleterious	pathogenic	rs121913343	cosm10659
L94	PR	c.C742T	7	50	p.R248W	Missense	Deleterious	Deleterious	pathogenic	rs121912651	cosm10656

Tabella 14. Dettaglio delle mutazioni a carico di TP53 rilevate tramite RNAseq.

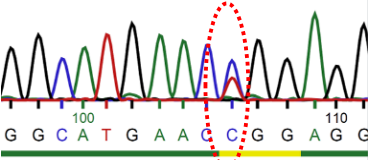
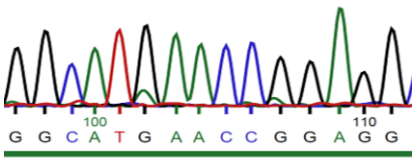
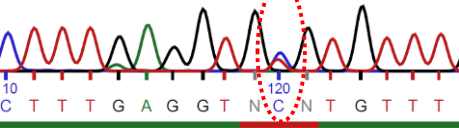
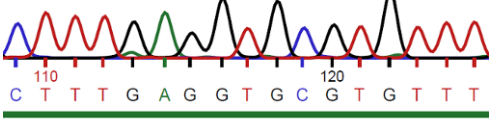
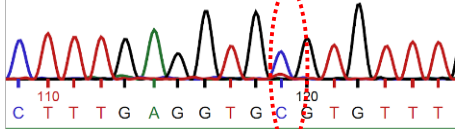
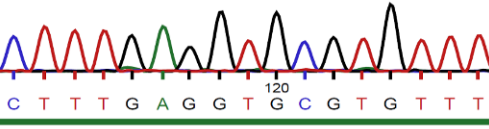
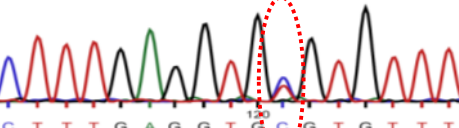
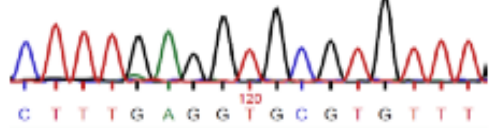
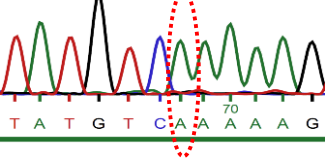
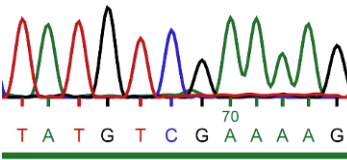
ID	Mutazione secondo RNA-seq	Sequenza tessuto tumorale	Sequenza tessuto sano
L94	c.C742T/p.R248W		
Sequenza completa dell'esone 7 e posizione della mutazione c.C742T (in giallo: sequenza in evidenza nell'elettroferogramma): GTTGGCTCTGACTGTACCACCATCCACTACAACATACATGTGTAACAGTTCCTGCATGGGGGGCATGAACC>TGGAGGCCATCCTCACCATCATCACACTGGAAGACTCCAG			
L84	c.C817T/p.R273C		
L86	c.C817T/p.R273C		
L92	wt		
Sequenze complete dell'esone 8 e posizione della mutazione c.C817T (in giallo: sequenza in evidenza nell'elettroferogramma): TGGAATCTACTGGGACGGAACAGCTTTGAGGTGC>TGTGTTTGTGCCTGTCCTGGGAGAGACCGGCGCACAGAGGAAGAGAATCTCCGCAAGAAAGGGGAGCCTCACCACGAGCTGCCCCAGGGAGCACTAAGCGAG			
L91 / R657	c.C637T/p.R213X		
Sequenza completa dell'esone 6 e posizione della mutazione c.C637T (in giallo: sequenza in evidenza nell'elettroferogramma) GTCTGGCCCTCCTCAGCATCTATCCGAGTGAAGGAAATTTGCGTGTGGAGTATTTGGATGACAGAAAACA>CTTTTC>TGACATAGTGTGGTGGTCCCTATGAGCCGCTGAG Reverse complementary sequence: TATG TCG>AAAAAG			

Tabella 15. Elettroferogrammi di validazione dei campioni identificati come mutati tramite NGS. Per ciascun campione vengono mostrate le sequenze del tessuto tumorale e del tessuto sano di riferimento

Esoni	Mutazione	N. Pazienti	Casistica	Annotazione
5	/	/	/	/
6	c.637C>T; p.R213X	1	RNA-Seq	cosm10654
7	c.742C>T; p.R248W	1	RNA-Seq	rs121912651
8-9	c.817C>T; p.R273C	3	RNA-Seq + Sanger cases	rs121913343
10	/	/	/	/
11	c.1157A>T; p.K386M	1	Sanger cases	<i>de novo</i>

Tabella 16. Riassunto mutazioni a carico di TP53 rilevate in 44 casi affetti da sarcoma di Ewing.

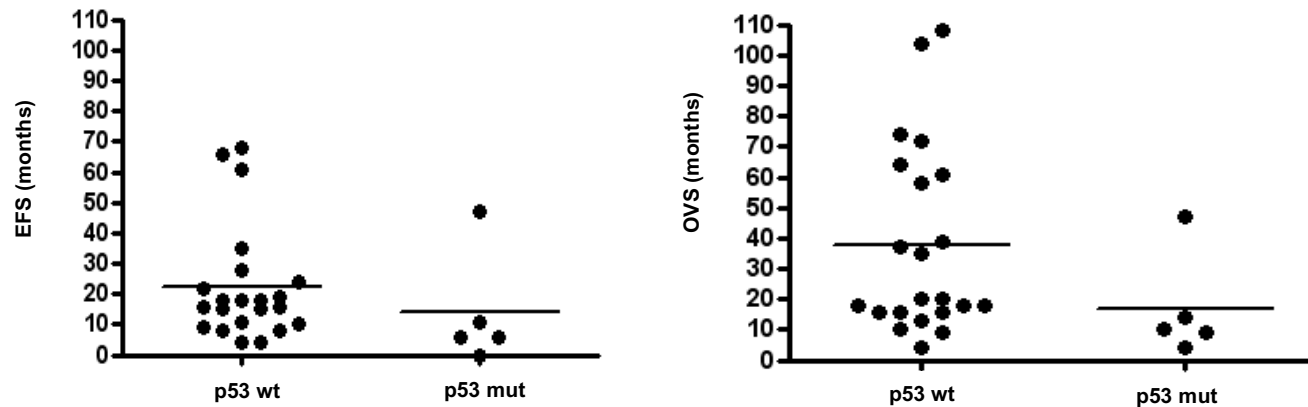


Figura 8. Tempi di sopravvivenza (EFS, OVS, months) di casi Ewing che ricadono (REL) suddivisi in base allo stato mutazionale di p53 alla diagnosi. Pazienti con p53 mutato hanno tempi di ricaduta e di sopravvivenza generale più bassi rispetto ai p53wt

4.3 Pazienti con diverso grado di risposta alla chemioterapia presentano livelli differenziali di espressione di lincRNAs

L'RNAseq ci ha permesso anche di indagare se ci fossero geni appartenenti al trascrittoma non codificante con espressione differenziale nel nostro gruppo di pazienti selezionati in base alla buona o scarsa risposta alla chemioterapia. L'attenzione si è focalizzata sulla classe dei lincRNAs, il cui ruolo biologico e di potenziale biomarker è emergente in diversi tipi di tumore, ma rimane relativamente inesplorato nel sarcoma di Ewing.

Nel nostro dataset, 349 lincRNAs sono stati considerati come espressi (almeno 3 reads in almeno 2 campioni). Da qui, per identificare lincRNAs differenzialmente espressi nei due gruppi di pazienti abbiamo settato una threshold di ± 1.5 fold change (FC) e $p < 0.05$, identificando una lista di 12 geni; 3 di questi risultano over-espressi nel gruppo PR rispetto al gruppo GR, mentre i restanti 9 risultano sotto-espressi (Tabella 16).

8/12 geni identificati sono poco o per nulla caratterizzati in letteratura (RP11-394O4.2, RP11-792D21.2, RP11-118B22.2, NCRNA00188, NCRNA00219, AC006276.1, AC004540.5, AL009179.2), mentre recenti studi hanno evidenziato un ruolo per SNHG8 ed SNNG5 in tumori gastrici (Huang et al., 2016) (Zhao et al., 2017), cancro del colon-retto (Damas et al., 2016) e leucemia mieloide cronica (He et al., 2017). È interessante notare come i lincRNAs differenzialmente espressi restituiti dalla nostra analisi comprendano NCRNA00277 (noto anche come EWSAT1, Ewing sarcoma associated transcript 1), ad oggi l'unico lincRNA descritto in letteratura come associato al sarcoma di Ewing (Marques Howarth et al., 2014).

	gene_class	AveExpr	logFC_PR.vs.GR	PR_log2.Mean	GR_log2.Mean	P.Value
RP11-394O4.2	lincRNA	-0,176	1,831	0,803	-1,154	1,62E-02
RP11-792D21.2	lincRNA	1,278	1,378	1,962	0,593	3,07E-02
RP11-118B22.2	lincRNA	0,659	0,992	1,215	0,104	3,38E-02
NCRNA00188	lincRNA	8,048	-0,680	7,701	8,394	2,62E-02
ZNF518A	lincRNA	5,787	-0,681	5,447	6,126	3,77E-02
SNHG5	lincRNA	7,040	-0,826	6,630	7,451	2,99E-02
NCRNA00219	lincRNA	5,397	-0,972	4,927	5,868	1,23E-02
AC006276.1	lincRNA	3,510	-1,051	2,954	4,066	2,29E-02
NCRNA00277	lincRNA	5,525	-1,113	4,956	6,094	2,50E-02
SNHG8	lincRNA	6,030	-1,250	5,425	6,635	3,74E-03
AC004540.5	lincRNA	1,757	-1,820	0,882	2,631	2,34E-02
AL009179.2	lincRNA	2,726	-2,727	1,461	3,990	1,26E-02

Tabella 16. lincRNAs con espressione differenziale in pazienti affetti da sarcoma di Ewing selezionati in base alla risposta alla chemioterapia.

DISCUSSIONE

Il sarcoma di Ewing è il secondo tumore dell'osso più diffuso (dopo l'osteosarcoma), colpisce prevalentemente adolescenti e giovani adulti, e mostra un decorso estremamente aggressivo: quasi 1/3 dei pazienti ricade in seguito al trattamento, e circa ¼ dei pazienti si presenta con metastasi alla diagnosi. La stratificazione dei pazienti in base al rischio alla diagnosi avviene attualmente sulla base di elementi clinico-patologici: presenza o assenza di metastasi alla diagnosi, dimensioni o volume tumorale, necrosi tumorale in seguito a chemioterapia di induzione. Sebbene la sopravvivenza a 5 anni dei pazienti con malattia localizzata alla diagnosi sia intorno al 70%, questi pazienti soffrono le conseguenze di tossicità acuta e a lungo termine legata alla chemioterapia. Per questo motivo, ed anche alla luce della giovane età dei pazienti, è auspicabile lo sviluppo di biomarcatori molecolari che permettano di dirigere ciascun paziente ad un protocollo di trattamento personalizzato in relazione al rischio.

Il presente studio conferma LGALS3BP e miR-34a come predittori indipendenti dell'esito clinico su una casistica di 124 pazienti affetti da sarcoma di Ewing localizzato alla diagnosi, trattati presso un singolo Istituto. Pazienti con elevati livelli di espressione di queste molecole hanno un rischio ridotto di sviluppare recidive locali o metastasi (HR 0.402, 95% CI 0.190-0.850 per LGALS3BP; HR 0.485, 95% CI 0.236 - 0.996 per miR-34a), ed un rischio ridotto di decesso legato al tumore (HR 0.397, 95% CI 0.159-0.993 per LGALS3BP; HR 0.353, 95% CI 0.132-0.943 per miR-34a).

Il gene LGALS3BP (Lectin, Galactoside-Binding, Soluble, 3 Binding Protein, noto anche come Mac-2 BP o 90K) codifica per una glicoproteina oligomerica di secrezione ad alto peso molecolare (1000-1500 kDa), capace di legare membri della famiglia delle galectine (Gal-3, Gal-1, Gal-7) (Koths et al., 1993; Tinari et al., 2001). Numerosi studi hanno suggerito un ruolo di LGALS3BP nel favorire la progressione e il potenziale metastatico tumorale (Grassadonia et al., 2002), mostrando come livelli aumentati di LGALS3BP tissutale o circolante siano correlati ad un peggiore esito clinico in casi di carcinoma mammario (Grassadonia et al., 2002; Tinari et al., 2009), carcinoma epatocellulare (Grassadonia et al., 2002; Tinari et al., 2009), mesotelioma pleurico (Strizzi et al., 2002), carcinoma pancreatico (Kunzli et al., 2002), carcinoma polmonare non a piccole cellule (Marchetti et al., 2002) e neuroblastoma (Morandi et al., 2011). Al contrario, il presente studio, validando e corroborando precedenti risultati ottenuti su casistiche meno numerose (Zambelli et al., 2010), accresce l'evidenza a favore di una funzione anti-tumorale di LGALS3BP nel sarcoma di Ewing, e inquadra elevati livelli di espressione di questa molecola a livello tumorale come fattore prognostico positivo. Come precedentemente evidenziato, l'over-espressione di LGALS3BP è associata ad un ridotto potenziale

invasivo e migratorio e ad una aumentata adesione omotipica in linee cellulari di sarcoma di Ewing *in vitro*, ed una riduzione del potenziale metastatico *in vivo* (Zambelli et al., 2010): pazienti con elevata espressione di LGALS3BP hanno dunque una ridotta probabilità di sviluppare metastasi e morire.

Studi recenti hanno mostrato come la bassa espressione di LGALS3BP favorisca la progressione dei carcinomi del colon-retto e sia associata ad una cattiva prognosi (Piccolo et al., 2015). In questo contesto, l'attività antitumorale di LGALS3BP sembra esplicarsi tramite inibizione del signaling di Wnt/ β -catenina secondo un meccanismo che prevede l'interazione di LGALS3BP secretorio con CD9/CD82 alla superficie cellulare, ISGilazione della β -catenina citoplasmatica con conseguente ubiquitinazione e degradazione proteasoma-dipendente (Lee et al., 2010).

Le componenti dell'asse Wnt/Frizzled/ β -catenina sono espresse e funzionali nel sarcoma di Ewing (Uren et al., 2004); la pathway può essere attivata da Wnt3a (Pedersen et al., 2016), ed RSPO2 (Scannell et al., 2013) esogeni, e diversamente dai tumori epiteliali, l'effetto fenotipico predominante è l'aumento della motilità cellulare piuttosto che della proliferazione, suggerendo un'influenza sul potenziale metastatico (Pridgeon et al., 2017). Lo stato di attivazione di Wnt/ β -catenina mostra un certo grado di eterogeneità intra- ed inter-tumorale, e pazienti con segni di attivazione di questa pathway hanno un peggior esito clinico sia in termini di EFS che OVS (Pedersen et al., 2016).

Non esistono al momento studi che indagano direttamente la relazione tra LGALS3BP e l'asse Wnt/ β -catenina nel sarcoma di Ewing, ma è allettante ipotizzare che l'esito clinico più favorevole osservato nei pazienti alto-espressanti possa essere mediato da un meccanismo autocrino o paracrino in cui LGALS3BP promuove la degradazione della β -catenina intracellulare in maniera analoga a quanto descritto nel carcinoma del colon-retto (Lee et al., 2010), unico altro tipo di tumore in cui LGALS3BP sembra avere una funzione anti-tumorale.

Le informazioni relative all'espressione di CD9 e CD82 nel sarcoma di Ewing sono limitate a pochi studi piuttosto datati, che hanno evidenziato un variabile (e generalmente basso) grado di espressione in linee cellulari e tumori primari (Aryee et al., 2002; Mechttersheimer et al., 1993; Pilkington and Pallesen, 1989). Nel recente studio di whole transcriptome sequencing da noi effettuato su un gruppo di 15 biopsie Ewing, i trascritti CD9 e CD82, seppur a livelli inferiori rispetto a geni housekeeping (GAPDH) o a marcatori noti del sarcoma di Ewing quali CD99, sono comunque detectabili (il fold change rispetto alla GAPDH è di 1.2, 0.9, 0.7 e 0.5 per CD99, LGALS3BP, CD9 e CD82 rispettivamente), supportando l'ipotesi che la via di ISGilazione e degradazione proteasomale della β -catenina innescata dall'interazione di LGALS3BP con CD9/CD82 possa in linea di principio essere

attivata.

miR-34a viene descritto in letteratura come microRNA oncosoppressore in virtù della sua capacità di inibire la funzione di target che mediano processi cellulari quali apoptosi, proliferazione e progressione del ciclo cellulare, migrazione, invasione e differenziamento (Misso et al., 2014). In linea con questa funzione, i livelli di espressione di miR-34a sono down-regolati in una varietà di tumori quali carcinoma mammario, prostatico, cancro della vescica, glioma e neuroblastoma (Li et al., 2014b).

La rilevanza di miR-34a nel sarcoma di Ewing è emersa in seguito ad uno studio di miRNA profiling effettuato su pazienti selezionati in base alla diversa storia clinica (early relapse vs no relapse), che lo ha identificato come il miRNA maggiormente associato ad EFS ed OVS (Nakatani et al., 2012). La valutazione di miR-34a tramite PCR Realtime nel presente studio ha mostrato, in una casistica ad oggi estesa a 124 pazienti, che miR-34a è down-regolato nella maggior parte dei pazienti (97/124, 78.2%) rispetto alle cellule staminali mesenchimali utilizzate come calibratore, e che pazienti alto-esprimenti hanno un migliore esito clinico rispetto a pazienti basso-esprimenti, confermando quindi il valore prognostico dei livelli di espressione di questo miRNA.

Un aspetto importante nello sviluppo di un potenziale biomarker è la possibilità di quantificarlo in maniera rapida e non invasiva per il paziente. È stato quindi effettuato uno studio preliminare di quantificazione di miR-34a nel plasma di pazienti affetti da sarcoma di Ewing a diverse tempistiche del percorso diagnostico terapeutico nel contesto dello studio prospettico PROVABES. Sebbene il numero limitato e l'elevata eterogeneità clinica dei pazienti arruolati non abbia permesso di evidenziare un chiaro pattern di evoluzione dei livelli plasmatici di miR-34a, resta comunque importante l'avvenuta definizione ed implementazione di un protocollo di raccolta e processamento del sangue, stoccaggio del plasma/RNA e quantificazione di miR-34a (ma applicabile anche ad altri miRNA) che riteniamo potrà permettere di ottenere informazioni rilevanti sul valore prognostico di questa molecola in un setting prospettico una volta raggiunto un numero più consistente di pazienti arruolati.

È stato precedentemente riportato che nel sarcoma di Ewing uno dei target di maggiore rilevanza per miR-34a sembra essere CCND1, gene chiave nella regolazione positiva del ciclo cellulare e della proliferazione (Marino et al., 2014). L'attivazione aberrante delle vie mediate da CCND1 è una caratteristica comune a molti tipi di tumore, e viene realizzata tramite meccanismi diversi che comprendono l'over-espressione, amplificazione genica, riarrangiamenti cromosomici, mutazioni intra-geniche (evento più raro) e disregolazione delle varianti di splicing (Musgrove et al., 2011).

Sono infatti riportate in letteratura due isoforme di CCND1: l'isoforma canonica o 'full length' CCND1A, codificata da 5 esoni, e l'isoforma CCND1B caratterizzata dalla ritenzione di parte dell'introne 4 ed esclusione dell'esone 5 dal trascritto maturo (Betticher et al., 1995). I primi studi di caratterizzazione funzionale hanno evidenziato un maggiore potenziale oncogenico dell'isoforma 1B rispetto all'isoforma full length (Lu et al., 2003; Solomon et al., 2003), evidenza confermata anche più recentemente in un nuovo modello genetico *in vivo*, ingegnerizzato per la produzione selettiva di CCND1B sotto il controllo del suo promotore fisiologico (Augello et al., 2015).

Nel sarcoma di Ewing, è stato dimostrato come EWS-FLI1 stimoli direttamente la trascrizione di CCND1 e sia in grado di favorire la produzione dell'isoforma 1B tramite un meccanismo che prevede il rallentamento dell'RNA polimerasi II in fase di allungamento, evento che favorisce l'utilizzo di un sito di poli-adenilazione debole (e solitamente sfavorito) all'interno dell'introne 4 (Sanchez et al., 2008). Lo stesso studio esplora la rilevanza dell'isoforma 1B sul fenotipo cellulare del sarcoma di Ewing, mostrando come il silenziamento di questa si associ ad una riduzione della proliferazione nella linea cellulare A673.

In linea con quanto riportato, abbiamo osservato che circa l'80% dei pazienti nella nostra casistica di studio hanno livelli di espressione di CCND1B superiori di almeno 1.5 volte rispetto alle cellule staminali mesenchimali (prive della proteina di fusione EWS-FLI1) utilizzate come calibratore. L'analisi di correlazione dei livelli di espressione di miR-34a con le due isoforme di ciclina D1 ha mostrato sorprendentemente una correlazione negativa statisticamente significativa solo con l'isoforma 1B. Sebbene ulteriori studi siano necessari per stabilire con maggiore chiarezza il ruolo di CCND1B nel sarcoma di Ewing, questi risultati suggeriscono che in questo contesto tumorale il ruolo oncosoppressore di miR-34a si espliciti antagonizzando gli effetti oncogenici di CCND1B, la cui espressione è direttamente favorita da EWS-FLI1.

La relazione tra modulazione dei livelli di miR-34a e fenotipo tumorale è stata precedentemente indagata nel sarcoma di Ewing sfruttando sistemi di espressione transienti *in vitro* (miRNA-mimetici o antago-miRs). Questi studi hanno evidenziato come linee cellulari in cui l'over-espressione di miR-34a sia accompagnata da riduzione della proliferazione cellulare, riduzione della crescita in condizioni di ancoraggio-indipendenza, ed aumentata sensibilità a farmaci chemioterapici (Nakatani et al., 2012).

Nel presente studio, tramite l'utilizzo di un sistema di espressione lentivirale, abbiamo ottenuto un modello cellulare di over-espressione stabile di miR-34a. Oltre a confermare *in vitro* il fenotipo di ridotta proliferazione, invasività e aumentata sensibilità a farmaci chemioterapici, questo modello ci

ha permesso di indagare l'effetto biologico dell'over-espressione di miR-34a in un setting *in vivo*, rivelando come questa si accompagni alla riduzione (o, in uno dei cloni analizzati, alla perdita) del potenziale tumorigenico.

I risultati ottenuti, oltre a confermare la rilevanza clinica e biologica di miR-34a nel sarcoma di Ewing, sostengono il razionale per il possibile utilizzo di nuovi agenti terapeutici volti al ripristino dell'espressione di questo miRNA, approccio già in fase di sviluppo preclinico per il mieloma multiplo (Cosco et al., 2015; Di Martino et al., 2014; Di Martino et al., 2012) e clinico per pazienti con tumori solidi in stadio avanzato (Beg et al., 2017).

Con l'obiettivo di identificare alterazioni tumore-specifiche (riarrangiamenti cromosomici o SNVs) correlate alla risposta alla chemioterapia, è stato applicato un approccio di RNA-sequencing su campioni diagnostici ottenuti da pazienti selezionati sulla base del diverso esito clinico: 7 pazienti ricaduti entro 3 mesi dall'inizio del trattamento, e 8 pazienti liberi da malattia a 6 anni dal trattamento. La ricerca di trascritti di fusione ricorrenti ha identificato i trascritti EWS-ETS caratteristici del sarcoma di Ewing in 14/15 dei pazienti analizzati (la presenza del trascritto EWS-FLI1 nel campione risultato negativo al sequenziamento è stata successivamente confermata in PCR), ma non ha rivelato trascritti di fusione alternativi. Questo è in accordo con quanto riportato da recenti studi che hanno indagato il panorama genomico del sarcoma di Ewing tramite approcci combinati di next generation sequencing, in cui trascritti di fusione alternativi sono stati detectati in campioni negativi per i trascritti EWS-ETS, e il cui profilo di espressione genica supporta l'ipotesi che rappresentino una variante distinta di tumori a piccole cellule tondeggianti (Brohl et al., 2014).

La ricerca di SNVs non silenti che ricorressero con frequenze diverse nei due gruppi di pazienti ha evidenziato 3 diverse mutazioni a carico di TP53 (p.R213X, p.R273C e p.R248W) in 4/7 pazienti con scarsa risposta alla chemioterapia; queste mutazioni sono risultate essere di natura somatica, e non sono state rilevate in nessuno dei pazienti con buona risposta alla chemioterapia. La ricerca di mutazioni a carico di p53 in una casistica più estesa ha identificato inoltre p.K386M, mutazione *de novo*. Con l'eccezione di quest'ultima, le modificazioni identificate sono annotate nei database dbSNPs e Cosmic, ed il loro coinvolgimento in diversi tipi di tumore è riportato in letteratura. R248W e R273C (dbSNPs: [rs121912651](#) e [rs121913343](#) ; Cosmic : [cosm10656](#) e [cosm10659](#)) sono i due principali hot spot di p53, con una frequenza di mutazione nei tumori del 7% e 6.7% (Freed-Pastor and Prives, 2012). Sono entrambe predette come mutazioni gain-of-function, e sono descritte in una varietà di carcinomi (Frebourg et al., 1995; Malkin et al., 1990; Sjoblom et al., 2006) e sarcomi (Cordon-Cardo et al., 1994; Ryu et al., 2007), inclusi osteosarcoma e sarcoma di Ewing per la

sostituzione R273C (Aryee et al., 2002; Komuro et al., 1993; Kovar et al., 1993; Overholtzer et al., 2003). Sostituzioni a carico della posizione 213 (Cosmic id cosm10654) sono annotate in diversi tumori, anche se raramente come inserzione di uno stop codon; la mutazione R213X è stata comunque descritta nella sindrome di Li-Fraumeni (Kato et al., 2011), nell'osteosarcoma (Dekairelle et al., 2004) e nella leucemia mieloide cronica (Mori et al., 1992). Sebbene le mutazioni a carico di p53 siano tra le più frequenti variazioni detectate in un tumore geneticamente stabile come il sarcoma di Ewing (Crompton et al., 2014; Tirode et al., 2014), il loro valore prognostico è argomento di dibattito. I risultati del presente studio suggeriscono che il rilevamento di mutazioni di p53 alla diagnosi possa identificare una classe di pazienti con scarsa risposta alla chemioterapia e decorso particolarmente rapido, in accordo con precedenti studi (Abudu et al., 1999; Amir et al., 2002; Huang et al., 2005; Tirode et al., 2014). Un recente studio prospettico del Children's Oncology Group (COG) non ha però confermato un'associazione statisticamente significativa tra lo status di p53 e l'esito clinico dei pazienti arruolati (Lerman et al., 2015), sollevando dubbi sull'effettivo potere prognostico di questo tipo di indagine. Alla luce delle numerose evidenze raccolte su casistiche retrospettive, e considerando che a causa della bassa frequenza delle mutazioni a carico di p53 il gruppo di pazienti mutati inclusi nello studio COG è limitato ad 8 pazienti, riteniamo che sia comunque auspicabile l'estensione di questo tipo di indagine a casistiche prospettiche più estese.

L'approccio di RNA-sequencing utilizzato nel presente studio ci ha infine permesso di indagare il trascrittoma non codificante per la presenza di lincRNAs potenzialmente associati alla risposta alla chemioterapia. Siamo così riusciti ad identificare una lista di 12 geni con espressione differenziale in pazienti con buona o scarsa risposta alla chemioterapia, la maggior parte dei quali poco o per nulla caratterizzati. Tra i geni identificati è incluso NCRNA00277 (noto anche come EWSAT1, Ewing sarcoma associated transcript 1), recentemente riportato in letteratura come target di EWS-FLI1 e suo alleato nel promuovere l'oncogenesi nel sarcoma di Ewing (Marques Howarth et al., 2014). Sorprendentemente, nel nostro dataset EWSAT1 sembra essere maggiormente espresso nel gruppo di pazienti con buona risposta alla chemioterapia rispetto a quelli con scarsa risposta, fenomeno inatteso in considerazione del ruolo pro-tumorale descritto per questo lincRNA. Una spiegazione a questa discrepanza potrebbe risiedere nel fatto che lo studio di Marques Howarth et al. identifica EWSAT1 come target di EWS-FLI1 di tipo 1, mentre 6/7 pazienti con scarsa risposta presentano trascritti di fusione EWS-FLI1 non di tipo 1 (3/8 pazienti con buona risposta presentano trascritti di fusione EWS-FLI1 di tipo 1). Le conoscenze sul ruolo dei lincRNA nel sarcoma di Ewing sono ad oggi piuttosto limitate; questo studio offre un punto di partenza per l'esplorazione di nuovi meccanismi di rilevanza clinica e biologica in questo tipo di tumore.

CONCLUSIONI

Questo studio conferma il valore prognostico indipendente dei livelli di espressione di LGALS3BP e miR-34a in una casistica di 124 pazienti affetti da sarcoma di Ewing localizzato alla diagnosi, trattati presso un singolo Istituto, inquadrando elevati livelli tumorali di queste molecole come fattori associati ad un ridotto rischio di ricadute e decessi tumore-correlati. Viene inoltre fornita evidenza della fattibilità della quantificazione di miR-34a circolante in maniera non invasiva per il paziente, caratteristica fondamentale nello sviluppo di nuovi biomarkers. Sviluppando un modello di over-espressione stabile di miR-34a ne abbiamo confermato *in vitro* e *in vivo* il ruolo oncosoppressore; studiandone la relazione con le isoforme di ciclina D1, uno dei suoi target sperimentalmente validati, siamo inoltre arrivati a formulare un'ipotesi sul meccanismo d'azione di questo miRNA, che sembra esplicarsi tramite inibizione dell'isoforma oncogenica CCND1B, la cui espressione è direttamente favorita da EWS-FLI1. Tramite un approccio di whole transcriptome sequencing su biopsie pre-trattamento ottenute da pazienti selezionati in base alla differenziale risposta alla chemioterapia, sono state identificate 4 mutazioni a carico di p53, di cui una *de novo*, che identificano una classe di pazienti con scarsa risposta al trattamento, ed un pannello di lincRNAs con espressione differenziale nei due gruppi di pazienti. Nell'insieme questi risultati concorrono alla definizione di uno spettro di caratteristiche molecolari del sarcoma di Ewing in grado di influenzare l'esito clinico dei pazienti, e che riteniamo possano essere promettenti candidati per la validazione in studi prospettici.

BIBLIOGRAFIA

Abudu, A., Mangham, D.C., Reynolds, G.M., Pynsent, P.B., Tillman, R.M., Carter, S.R., and Grimer, R.J. (1999). Overexpression of p53 protein in primary Ewing's sarcoma of bone: relationship to tumour stage, response and prognosis. *Br J Cancer* 79, 1185-1189.

Allegra, C.J., Jessup, J.M., Somerfield, M.R., Hamilton, S.R., Hammond, E.H., Hayes, D.F., McAllister, P.K., Morton, R.F., and Schilsky, R.L. (2009). American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. *J Clin Oncol* 27, 2091-2096.

Amir, G., Issakov, J., Meller, I., Sucher, E., Peyser, A., Cohen, I.J., Yaniv, I., Ben Arush, M.W., Tavori, U., Kollender, Y., *et al.* (2002). Expression of p53 gene product and cell proliferation marker Ki-67 in Ewing's sarcoma: correlation with clinical outcome. *Hum Pathol* 33, 170-174.

Armand-Labit, V., and Pradines, A. (2017). Circulating cell-free microRNAs as clinical cancer biomarkers. *Biomol Concepts*.

Aryee, D.N., Ambros, I., Ambros, P.F., Muehlbacher, K., Luegmayr, A., Yoshie, O., and Kovar, H. (2002). Frequent low level expression in Ewing sarcoma family tumors and widespread absence of the metastasis suppressor KAI1/CD82 in neuroblastoma. *Pediatr Res* 52, 279-285.

Ash, S., Luria, D., Cohen, I.J., Goshen, Y., Toledano, H., Issakov, J., Yaniv, I., and Avigad, S. (2011). Excellent prognosis in a subset of patients with Ewing sarcoma identified at diagnosis by CD56 using flow cytometry. *Clin Cancer Res* 17, 2900-2907.

Augello, M.A., Berman-Booty, L.D., Carr, R., 3rd, Yoshida, A., Dean, J.L., Schiewer, M.J., Feng, F.Y., Tomlins, S.A., Gao, E., Koch, W.J., *et al.* (2015). Consequence of the tumor-associated conversion to cyclin D1b. *EMBO Mol Med* 7, 628-647.

Balamuth, N.J., and Womer, R.B. (2010). Ewing's sarcoma. *Lancet Oncol* 11, 184-192.

Beg, M.S., Brenner, A.J., Sachdev, J., Borad, M., Kang, Y.K., Stoudemire, J., Smith, S., Bader, A.G., Kim, S., and Hong, D.S. (2017). Phase I study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, administered twice weekly in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs* 35, 180-188.

Betticher, D.C., Thatcher, N., Altermatt, H.J., Hoban, P., Ryder, W.D., and Heighway, J. (1995). Alternate splicing produces a novel cyclin D1 transcript. *Oncogene* 11, 1005-1011.

Bhan, A., Soleimani, M., and Mandal, S.S. (2017). Long Noncoding RNA and Cancer: A New Paradigm. *Cancer Res* 77, 3965-3981.

Brohl, A.S., Solomon, D.A., Chang, W., Wang, J., Song, Y., Sindiri, S., Patidar, R., Hurd, L., Chen, L., Shern, J.F., *et al.* (2014). The genomic landscape of the Ewing Sarcoma family of tumors reveals recurrent STAG2 mutation. *PLoS Genet* 10, e1004475.

Chansky, H.A., Barahmand-Pour, F., Mei, Q., Kahn-Farooqi, W., Zielinska-Kwiatkowska, A., Blackburn, M., Chansky, K., Conrad, E.U., 3rd, Bruckner, J.D., Greenlee, T.K., *et al.* (2004). Targeting of EWS/FLI-1 by RNA interference attenuates the tumor phenotype of Ewing's sarcoma cells in vitro. *J Orthop Res* 22, 910-917.

Choi, Y., and Chan, A.P. (2015). PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinformatics* 31, 2745-2747.

Cohen-Gogo, S., Cellier, C., Coindre, J.M., Mosseri, V., Pierron, G., Guillemet, C., Italiano, A., Brugieres, L., Orbach, D., Laurence, V., *et al.* (2014). Ewing-like sarcomas with BCOR-CCNB3 fusion transcript: a clinical, radiological and pathological retrospective study from the Societe Francaise des Cancers de L'Enfant. *Pediatr Blood Cancer* 61, 2191-2198.

Cordon-Cardo, C., Latres, E., Drobnjak, M., Oliva, M.R., Pollack, D., Woodruff, J.M., Marechal, V., Chen, J., Brennan, M.F., and Levine, A.J. (1994). Molecular abnormalities of mdm2 and p53 genes in adult soft tissue sarcomas. *Cancer Res* 54, 794-799.

- Cosco, D., Cilurzo, F., Maiuolo, J., Federico, C., Di Martino, M.T., Cristiano, M.C., Tassone, P., Fresta, M., and Paolino, D. (2015). Delivery of miR-34a by chitosan/PLGA nanoplexes for the anticancer treatment of multiple myeloma. *Sci Rep* 5, 17579.
- Crompton, B.D., Stewart, C., Taylor-Weiner, A., Alexe, G., Kurek, K.C., Calicchio, M.L., Kiezun, A., Carter, S.L., Shukla, S.A., Mehta, S.S., *et al.* (2014). The genomic landscape of pediatric Ewing sarcoma. *Cancer Discov* 4, 1326-1341.
- Crowley, E., Di Nicolantonio, F., Loupakis, F., and Bardelli, A. (2013). Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol* 10, 472-484.
- Damas, N.D., Marcatti, M., Come, C., Christensen, L.L., Nielsen, M.M., Baumgartner, R., Gylling, H.M., Maglieri, G., Rundsten, C.F., Seemann, S.E., *et al.* (2016). SNHG5 promotes colorectal cancer cell survival by counteracting STAU1-mediated mRNA destabilization. *Nat Commun* 7, 13875.
- de Alava, E. (2017). Ewing Sarcoma, an Update on Molecular Pathology with Therapeutic Implications. *Surg Pathol Clin* 10, 575-585.
- de Alava, E., Antonescu, C.R., Panizo, A., Leung, D., Meyers, P.A., Huvos, A.G., Pardo-Mindan, F.J., Healey, J.H., and Ladanyi, M. (2000). Prognostic impact of P53 status in Ewing sarcoma. *Cancer* 89, 783-792.
- de Alava, E., Kawai, A., Healey, J.H., Fligman, I., Meyers, P.A., Huvos, A.G., Gerald, W.L., Jhanwar, S.C., Argani, P., Antonescu, C.R., *et al.* (1998). EWS-FLI1 fusion transcript structure is an independent determinant of prognosis in Ewing's sarcoma. *J Clin Oncol* 16, 1248-1255.
- Dekairelle, A.F., Brichard, B., Delhez, H., and Gala, J.L. (2004). Identification of a transcriptionally inactive p53 mutant by functional analysis of separated alleles in yeasts (FASAY) in a child osteosarcoma tumor: a case report. *Pediatr Hematol Oncol* 21, 321-328.
- Deniz, E., and Erman, B. (2017). Long noncoding RNA (lincRNA), a new paradigm in gene expression control. *Funct Integr Genomics* 17, 135-143.
- Di Martino, M.T., Campani, V., Misso, G., Gallo Cantafio, M.E., Gulla, A., Foresta, U., Guzzi, P.H., Castellano, M., Grimaldi, A., Gigantino, V., *et al.* (2014). In vivo activity of miR-34a mimics delivered by stable nucleic acid lipid particles (SNALPs) against multiple myeloma. *PLoS One* 9, e90005.
- Di Martino, M.T., Leone, E., Amodio, N., Foresta, U., Lionetti, M., Pitari, M.R., Cantafio, M.E., Gulla, A., Conforti, F., Morelli, E., *et al.* (2012). Synthetic miR-34a mimics as a novel therapeutic agent for multiple myeloma: in vitro and in vivo evidence. *Clin Cancer Res* 18, 6260-6270.
- Dylla, L., and Jedlicka, P. (2013). Growth-promoting role of the miR-106a~363 cluster in Ewing sarcoma. *PLoS One* 8, e63032.
- Dylla, L., Moore, C., and Jedlicka, P. (2013). MicroRNAs in Ewing Sarcoma. *Front Oncol* 3, 65.
- Easton, D.F., Ford, D., and Bishop, D.T. (1995). Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet* 56, 265-271.
- Ferrari, S., Sundby Hall, K., Luksch, R., Tienghi, A., Wiebe, T., Fagioli, F., Alvegard, T.A., Brach Del Prever, A., Tamburini, A., Alberghini, M., *et al.* (2011). Nonmetastatic Ewing family tumors: high-dose chemotherapy with stem cell rescue in poor responder patients. Results of the Italian Sarcoma Group/Scandinavian Sarcoma Group III protocol. *Ann Oncol* 22, 1221-1227.
- Franzetti, G.A., Laud-Duval, K., Bellanger, D., Stern, M.H., Sastre-Garau, X., and Delattre, O. (2013). MiR-30a-5p connects EWS-FLI1 and CD99, two major therapeutic targets in Ewing tumor. *Oncogene* 32, 3915-3921.
- Frebourg, T., Barbier, N., Yan, Y.X., Garber, J.E., Dreyfus, M., Fraumeni, J., Jr., Li, F.P., and Friend, S.H. (1995). Germ-line p53 mutations in 15 families with Li-Fraumeni syndrome. *Am J Hum Genet* 56, 608-615.
- Freed-Pastor, W.A., and Prives, C. (2012). Mutant p53: one name, many proteins. *Genes Dev* 26, 1268-1286.

- Gamberi, G., Cocchi, S., Benini, S., Magagnoli, G., Morandi, L., Kreshak, J., Gambarotti, M., Picci, P., Zanella, L., and Alberghini, M. (2011). Molecular diagnosis in Ewing family tumors: the Rizzoli experience--222 consecutive cases in four years. *J Mol Diagn* 13, 313-324.
- Garcia-Murillas, I., Schiavon, G., Weigelt, B., Ng, C., Hrebien, S., Cutts, R.J., Cheang, M., Osin, P., Nerurkar, A., Kozarewa, I., *et al.* (2015). Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer. *Sci Transl Med* 7, 302ra133.
- Gaspar, N., Hawkins, D.S., Dirksen, U., Lewis, I.J., Ferrari, S., Le Deley, M.C., Kovar, H., Grimer, R., Whelan, J., Claude, L., *et al.* (2015). Ewing Sarcoma: Current Management and Future Approaches Through Collaboration. *J Clin Oncol* 33, 3036-3046.
- Ge, H., Liu, K., Juan, T., Fang, F., Newman, M., and Hoeck, W. (2011). FusionMap: detecting fusion genes from next-generation sequencing data at base-pair resolution. *Bioinformatics* 27, 1922-1928.
- Gerlinger, M., Rowan, A.J., Horswell, S., Math, M., Larkin, J., Endesfelder, D., Gronroos, E., Martinez, P., Matthews, N., Stewart, A., *et al.* (2012). Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 366, 883-892.
- Goossens, N., Nakagawa, S., Sun, X., and Hoshida, Y. (2015). Cancer biomarker discovery and validation. *Transl Cancer Res* 4, 256-269.
- Goya, R., Sun, M.G., Morin, R.D., Leung, G., Ha, G., Wiegand, K.C., Senz, J., Crisan, A., Marra, M.A., Hirst, M., *et al.* (2010). SNVMix: predicting single nucleotide variants from next-generation sequencing of tumors. *Bioinformatics* 26, 730-736.
- Grassadonia, A., Tinari, N., Iurisci, I., Piccolo, E., Cumashi, A., Innominato, P., D'Egidio, M., Natoli, C., Piantelli, M., and Iacobelli, S. (2002). 90K (Mac-2 BP) and galectins in tumor progression and metastasis. *Glycoconj J* 19, 551-556.
- Hall, J.M., Lee, M.K., Newman, B., Morrow, J.E., Anderson, L.A., Huey, B., and King, M.C. (1990). Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science* 250, 1684-1689.
- Hayes, D.F., Bast, R.C., Desch, C.E., Fritsche, H., Jr., Kemeny, N.E., Jessup, J.M., Locker, G.Y., Macdonald, J.S., Mennel, R.G., Norton, L., *et al.* (1996). Tumor marker utility grading system: a framework to evaluate clinical utility of tumor markers. *J Natl Cancer Inst* 88, 1456-1466.
- He, B., Bai, Y., Kang, W., Zhang, X., and Jiang, X. (2017). LncRNA SNHG5 regulates imatinib resistance in chronic myeloid leukemia via acting as a CeRNA against MiR-205-5p. *Am J Cancer Res* 7, 1704-1713.
- Helman, L.J., and Meltzer, P. (2003). Mechanisms of sarcoma development. *Nat Rev Cancer* 3, 685-694.
- Henry, N.L., and Hayes, D.F. (2012). Cancer biomarkers. *Mol Oncol* 6, 140-146.
- Honoki, K., Stojanovski, E., McEvoy, M., Fujii, H., Tsujiuchi, T., Kido, A., Takakura, Y., and Attia, J. (2007). Prognostic significance of p16 INK4a alteration for Ewing sarcoma: a meta-analysis. *Cancer* 110, 1351-1360.
- Huang, H.Y., Illei, P.B., Zhao, Z., Mazumdar, M., Huvos, A.G., Healey, J.H., Wexler, L.H., Gorlick, R., Meyers, P., and Ladanyi, M. (2005). Ewing sarcomas with p53 mutation or p16/p14ARF homozygous deletion: a highly lethal subset associated with poor chemoresponse. *J Clin Oncol* 23, 548-558.
- Huang, T., Ji, Y., Hu, D., Chen, B., Zhang, H., Li, C., Chen, G., Luo, X., Zheng, X.W., and Lin, X. (2016). SNHG8 is identified as a key regulator of epstein-barr virus(EBV)-associated gastric cancer by an integrative analysis of lncRNA and mRNA expression. *Oncotarget* 7, 80990-81002.
- Iyer, M.K., Chinnaiyan, A.M., and Maher, C.A. (2011). ChimeraScan: a tool for identifying chimeric transcription in sequencing data. *Bioinformatics* 27, 2903-2904.
- Jahromi, M.S., Putnam, A.R., Druzgal, C., Wright, J., Spraker-Perlman, H., Kinsey, M., Zhou, H., Boucher, K.M., Randall, R.L., Jones, K.B., *et al.* (2012). Molecular inversion probe analysis detects novel copy number alterations in Ewing sarcoma. *Cancer Genet* 205, 391-404.
- Jordan, V.C. (2004). Selective estrogen receptor modulation: concept and consequences in cancer. *Cancer Cell* 5, 207-213.

- Karnuth, B., Dedy, N., Spieker, T., Lawlor, E.R., Gattenlohner, S., Ranft, A., Dirksen, U., Jurgens, H., and Brauning, A. (2014). Differentially expressed miRNAs in Ewing sarcoma compared to mesenchymal stem cells: low miR-31 expression with effects on proliferation and invasion. *PLoS One* 9, e93067.
- Kato, T., Ishikawa, K., Satoh, M., Kondo, S., and Kaji, M. (2011). Pleomorphic carcinoma of the lung arising in a patient with Li-Fraumeni syndrome: report of a case. *Surg Today* 41, 841-845.
- Komuro, H., Hayashi, Y., Kawamura, M., Hayashi, K., Kaneko, Y., Kamoshita, S., Hanada, R., Yamamoto, K., Hongo, T., Yamada, M., *et al.* (1993). Mutations of the p53 gene are involved in Ewing's sarcomas but not in neuroblastomas. *Cancer Res* 53, 5284-5288.
- Koths, K., Taylor, E., Halenbeck, R., Casipit, C., and Wang, A. (1993). Cloning and characterization of a human Mac-2-binding protein, a new member of the superfamily defined by the macrophage scavenger receptor cysteine-rich domain. *J Biol Chem* 268, 14245-14249.
- Kovar, H., Aryee, D.N., Jug, G., Henockl, C., Schemper, M., Delattre, O., Thomas, G., and Gadner, H. (1996). EWS/FLI-1 antagonists induce growth inhibition of Ewing tumor cells in vitro. *Cell Growth Differ* 7, 429-437.
- Kovar, H., Auinger, A., Jug, G., Aryee, D., Zoubek, A., Salzer-Kuntschik, M., and Gadner, H. (1993). Narrow spectrum of infrequent p53 mutations and absence of MDM2 amplification in Ewing tumours. *Oncogene* 8, 2683-2690.
- Kroh, E.M., Parkin, R.K., Mitchell, P.S., and Tewari, M. (2010). Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods* 50, 298-301.
- Kunzli, B.M., Berberat, P.O., Zhu, Z.W., Martignoni, M., Kleeff, J., Tempia-Caliera, A.A., Fukuda, M., Zimmermann, A., Friess, H., and Buchler, M.W. (2002). Influences of the lysosomal associated membrane proteins (Lamp-1, Lamp-2) and Mac-2 binding protein (Mac-2-BP) on the prognosis of pancreatic carcinoma. *Cancer* 94, 228-239.
- Ladenstein, R., Potschger, U., Le Deley, M.C., Whelan, J., Paulussen, M., Oberlin, O., van den Berg, H., Dirksen, U., Hjorth, L., Michon, J., *et al.* (2010). Primary disseminated multifocal Ewing sarcoma: results of the Euro-EWING 99 trial. *J Clin Oncol* 28, 3284-3291.
- Lawrence, M.S., Stojanov, P., Polak, P., Kryukov, G.V., Cibulskis, K., Sivachenko, A., Carter, S.L., Stewart, C., Mermel, C.H., Roberts, S.A., *et al.* (2013). Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature* 499, 214-218.
- Le Deley, M.C., Delattre, O., Schaefer, K.L., Burchill, S.A., Koehler, G., Hogendoorn, P.C., Lion, T., Poremba, C., Marandet, J., Ballet, S., *et al.* (2010). Impact of EWS-ETS fusion type on disease progression in Ewing's sarcoma/peripheral primitive neuroectodermal tumor: prospective results from the cooperative Euro-E.W.I.N.G. 99 trial. *J Clin Oncol* 28, 1982-1988.
- Lee, J.H., Bae, J.A., Lee, J.H., Seo, Y.W., Kho, D.H., Sun, E.G., Lee, S.E., Cho, S.H., Joo, Y.E., Ahn, K.Y., *et al.* (2010). Glycoprotein 90K, downregulated in advanced colorectal cancer tissues, interacts with CD9/CD82 and suppresses the Wnt/beta-catenin signal via ISGylation of beta-catenin. *Gut* 59, 907-917.
- Leon, S.A., Shapiro, B., Sklaroff, D.M., and Yaros, M.J. (1977). Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 37, 646-650.
- Lerman, D.M., Monument, M.J., McIlvaine, E., Liu, X.Q., Huang, D., Monovich, L., Beeler, N., Gorlick, R.G., Marina, N.M., Womer, R.B., *et al.* (2015). Tumoral TP53 and/or CDKN2A alterations are not reliable prognostic biomarkers in patients with localized Ewing sarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer* 62, 759-765.
- Li, J., You, T., and Jing, J. (2014a). MiR-125b inhibits cell biological progression of Ewing's sarcoma by suppressing the PI3K/Akt signalling pathway. *Cell Prolif* 47, 152-160.
- Li, X.J., Ren, Z.J., and Tang, J.H. (2014b). MicroRNA-34a: a potential therapeutic target in human cancer. *Cell Death Dis* 5, e1327.
- Li, Z., Yu, X., Shen, J., Wu, W.K., and Chan, M.T. (2015). MicroRNA expression and its clinical implications in Ewing's sarcoma. *Cell Prolif* 48, 1-6.

- Lin, P.P., Pandey, M.K., Jin, F., Xiong, S., Deavers, M., Parant, J.M., and Lozano, G. (2008). EWS-FLI1 induces developmental abnormalities and accelerates sarcoma formation in a transgenic mouse model. *Cancer Res* 68, 8968-8975.
- Llombart-Bosch, A., Machado, I., Navarro, S., Bertoni, F., Bacchini, P., Alberghini, M., Karzeladze, A., Savelov, N., Petrov, S., Alvarado-Cabrero, I., *et al.* (2009). Histological heterogeneity of Ewing's sarcoma/PNET: an immunohistochemical analysis of 415 genetically confirmed cases with clinical support. *Virchows Arch* 455, 397-411.
- Lopez-Guerrero, J.A., Machado, I., Scotlandi, K., Noguera, R., Pellin, A., Navarro, S., Serra, M., Calabuig-Farinas, S., Picci, P., and Llombart-Bosch, A. (2011). Clinicopathological significance of cell cycle regulation markers in a large series of genetically confirmed Ewing's sarcoma family of tumors. *Int J Cancer* 128, 1139-1150.
- Lu, F., Gladden, A.B., and Diehl, J.A. (2003). An alternatively spliced cyclin D1 isoform, cyclin D1b, is a nuclear oncogene. *Cancer Res* 63, 7056-7061.
- Maitra, A., Roberts, H., Weinberg, A.G., and Geradts, J. (2001). Aberrant expression of tumor suppressor proteins in the Ewing family of tumors. *Arch Pathol Lab Med* 125, 1207-1212.
- Malkin, D., Li, F.P., Strong, L.C., Fraumeni, J.F., Jr., Nelson, C.E., Kim, D.H., Kassel, J., Gryka, M.A., Bischoff, F.Z., Tainsky, M.A., *et al.* (1990). Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 250, 1233-1238.
- Marchetti, A., Tinari, N., Buttitta, F., Chella, A., Angeletti, C.A., Sacco, R., Mucilli, F., Ullrich, A., and Iacobelli, S. (2002). Expression of 90K (Mac-2 BP) correlates with distant metastasis and predicts survival in stage I non-small cell lung cancer patients. *Cancer Res* 62, 2535-2539.
- Marino, M.T., Grilli, A., Baricordi, C., Manara, M.C., Ventura, S., Pinca, R.S., Bellenghi, M., Calvaruso, M., Mattia, G., Donati, D., *et al.* (2014). Prognostic significance of miR-34a in Ewing sarcoma is associated with cyclin D1 and ki-67 expression. *Ann Oncol* 25, 2080-2086.
- Marques Howarth, M., Simpson, D., Ngok, S.P., Nieves, B., Chen, R., Siprashvili, Z., Vaka, D., Breese, M.R., Crompton, B.D., Alexe, G., *et al.* (2014). Long noncoding RNA EWSAT1-mediated gene repression facilitates Ewing sarcoma oncogenesis. *J Clin Invest* 124, 5275-5290.
- Mastrangelo, T., Modena, P., Tornielli, S., Bullrich, F., Testi, M.A., Mezzelani, A., Radice, P., Azzarelli, A., Pilotti, S., Croce, C.M., *et al.* (2000). A novel zinc finger gene is fused to EWS in small round cell tumor. *Oncogene* 19, 3799-3804.
- May, W.A., Gishizky, M.L., Lessnick, S.L., Lunsford, L.B., Lewis, B.C., Delattre, O., Zucman, J., Thomas, G., and Denny, C.T. (1993a). Ewing sarcoma 11;22 translocation produces a chimeric transcription factor that requires the DNA-binding domain encoded by FLI1 for transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5752-5756.
- May, W.A., Lessnick, S.L., Braun, B.S., Klemsz, M., Lewis, B.C., Lunsford, L.B., Hromas, R., and Denny, C.T. (1993b). The Ewing's sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene encodes a more potent transcriptional activator and is a more powerful transforming gene than FLI-1. *Mol Cell Biol* 13, 7393-7398.
- McPherson, A., Hormozdiari, F., Zayed, A., Giuliany, R., Ha, G., Sun, M.G., Griffith, M., Heravi Moussavi, A., Senz, J., Melnyk, N., *et al.* (2011). deFuse: an algorithm for gene fusion discovery in tumor RNA-Seq data. *PLoS Comput Biol* 7, e1001138.
- Mechtersheimer, G., Barth, T., Ludwig, R., Staudter, M., and Moller, P. (1993). Differential expression of leukocyte differentiation antigens in small round blue cell sarcomas. *Cancer* 71, 237-248.
- Misso, G., Di Martino, M.T., De Rosa, G., Farooqi, A.A., Lombardi, A., Campani, V., Zarone, M.R., Gulla, A., Tagliaferri, P., Tassone, P., *et al.* (2014). Mir-34: a new weapon against cancer? *Mol Ther Nucleic Acids* 3, e194.
- Morandi, F., Corrias, M.V., Levreri, I., Scaruffi, P., Raffaghello, L., Carlini, B., Bocca, P., Prigione, I., Stigliani, S., Amoroso, L., *et al.* (2011). Serum levels of cytoplasmic melanoma-associated antigen at diagnosis may predict clinical relapse in neuroblastoma patients. *Cancer Immunol Immunother* 60, 1485-1495.

Mori, N., Wada, M., Yokota, J., Terada, M., Okada, M., Teramura, M., Masuda, M., Hoshino, S., Motoji, T., Oshimi, K., *et al.* (1992). Mutations of the p53 tumour suppressor gene in haematologic neoplasms. *Br J Haematol* 81, 235-240.

Musgrove, E.A., Caldon, C.E., Barraclough, J., Stone, A., and Sutherland, R.L. (2011). Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nat Rev Cancer* 11, 558-572.

Nakatani, F., Ferracin, M., Manara, M.C., Ventura, S., Del Monaco, V., Ferrari, S., Alberghini, M., Grilli, A., Knuutila, S., Schaefer, K.L., *et al.* (2012). miR-34a predicts survival of Ewing's sarcoma patients and directly influences cell chemo-sensitivity and malignancy. *J Pathol* 226, 796-805.

Oberlin, O., Deley, M.C., Bui, B.N., Gentet, J.C., Philip, T., Terrier, P., Carrie, C., Mechinaud, F., Schmitt, C., Babin-Boillettot, A., *et al.* (2001). Prognostic factors in localized Ewing's tumours and peripheral neuroectodermal tumours: the third study of the French Society of Paediatric Oncology (EW88 study). *Br J Cancer* 85, 1646-1654.

Ohno, T., Rao, V.N., and Reddy, E.S. (1993). EWS/Fli-1 chimeric protein is a transcriptional activator. *Cancer Res* 53, 5859-5863.

Ouchida, M., Ohno, T., Fujimura, Y., Rao, V.N., and Reddy, E.S. (1995). Loss of tumorigenicity of Ewing's sarcoma cells expressing antisense RNA to EWS-fusion transcripts. *Oncogene* 11, 1049-1054.

Overholtzer, M., Rao, P.H., Favis, R., Lu, X.Y., Elowitz, M.B., Barany, F., Ladanyi, M., Gorlick, R., and Levine, A.J. (2003). The presence of p53 mutations in human osteosarcomas correlates with high levels of genomic instability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 11547-11552.

Overman, M.J., Modak, J., Kopetz, S., Murthy, R., Yao, J.C., Hicks, M.E., Abbruzzese, J.L., and Tam, A.L. (2013). Use of research biopsies in clinical trials: are risks and benefits adequately discussed? *J Clin Oncol* 31, 17-22.

Paik, S., Shak, S., Tang, G., Kim, C., Baker, J., Cronin, M., Baehner, F.L., Walker, M.G., Watson, D., Park, T., *et al.* (2004). A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 351, 2817-2826.

Palmerini, E., Colangeli, M., Nanni, C., Fanti, S., Marchesi, E., Paioli, A., Picci, P., Cambioli, S., Donati, D., Cevolani, L., *et al.* (2017). The role of FDG PET/CT in patients treated with neoadjuvant chemotherapy for localized bone sarcomas. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 44, 215-223.

Paulussen, M., Bielack, S., Jurgens, H., Casali, P.G., and Group, E.G.W. (2009). Ewing's sarcoma of the bone: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 20 Suppl 4, 140-142.

Pedersen, E.A., Menon, R., Bailey, K.M., Thomas, D.G., Van Noord, R.A., Tran, J., Wang, H., Qu, P.P., Hoering, A., Fearon, E.R., *et al.* (2016). Activation of Wnt/beta-Catenin in Ewing Sarcoma Cells Antagonizes EWS/ETS Function and Promotes Phenotypic Transition to More Metastatic Cell States. *Cancer Res* 76, 5040-5053.

Piccart-Gebhart, M.J., Procter, M., Leyland-Jones, B., Goldhirsch, A., Untch, M., Smith, I., Gianni, L., Baselga, J., Bell, R., Jackisch, C., *et al.* (2005). Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 353, 1659-1672.

Picci, P., Bohling, T., Bacci, G., Ferrari, S., Sangiorgi, L., Mercuri, M., Ruggieri, P., Manfrini, M., Ferraro, A., Casadei, R., *et al.* (1997). Chemotherapy-induced tumor necrosis as a prognostic factor in localized Ewing's sarcoma of the extremities. *J Clin Oncol* 15, 1553-1559.

Piccolo, E., Tinari, N., D'Addario, D., Rossi, C., Iacobelli, V., La Sorda, R., Lattanzio, R., D'Egidio, M., Di Risio, A., Piantelli, M., *et al.* (2015). Prognostic relevance of LGALS3BP in human colorectal carcinoma. *J Transl Med* 13, 248.

Pilkington, G.R., and Pallesen, G. (1989). Phenotypic characterization of non-haemopoietic small cell tumours of childhood with monoclonal antibodies to leucocytes, epithelial cells and cytoskeletal proteins. *Histopathology* 14, 347-357.

Pinto, A., Dickman, P., and Parham, D. (2011). Pathobiologic markers of the ewing sarcoma family of tumors: state of the art and prediction of behaviour. *Sarcoma* 2011, 856190.

- Prensner, J.R., and Chinnaiyan, A.M. (2011). The emergence of lncRNAs in cancer biology. *Cancer Discov* 1, 391-407.
- Pridgeon, M.G., Grohar, P.J., Steensma, M.R., and Williams, B.O. (2017). Wnt Signaling in Ewing Sarcoma, Osteosarcoma, and Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors. *Curr Osteoporos Rep* 15, 239-246.
- Riggi, N., Cironi, L., Provero, P., Suva, M.L., Kaloulis, K., Garcia-Echeverria, C., Hoffmann, F., Trumpp, A., and Stamenkovic, I. (2005). Development of Ewing's sarcoma from primary bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Cancer Res* 65, 11459-11468.
- Riggi, N., and Stamenkovic, I. (2007). The Biology of Ewing sarcoma. *Cancer Lett* 254, 1-10.
- Riggi, N., Suva, M.L., De Vito, C., Provero, P., Stehle, J.C., Baumer, K., Cironi, L., Janiszewska, M., Petricevic, T., Suva, D., *et al.* (2010). EWS-FLI-1 modulates miRNA145 and SOX2 expression to initiate mesenchymal stem cell reprogramming toward Ewing sarcoma cancer stem cells. *Genes Dev* 24, 916-932.
- Riggi, N., Suva, M.L., Suva, D., Cironi, L., Provero, P., Tercier, S., Joseph, J.M., Stehle, J.C., Baumer, K., Kindler, V., *et al.* (2008). EWS-FLI-1 expression triggers a Ewing's sarcoma initiation program in primary human mesenchymal stem cells. *Cancer Res* 68, 2176-2185.
- Rocchi, A., Manara, M.C., Sciandra, M., Zambelli, D., Nardi, F., Nicoletti, G., Garofalo, C., Meschini, S., Astolfi, A., Colombo, M.P., *et al.* (2010). CD99 inhibits neural differentiation of human Ewing sarcoma cells and thereby contributes to oncogenesis. *J Clin Invest* 120, 668-680.
- Romond, E.H., Perez, E.A., Bryant, J., Suman, V.J., Geyer, C.E., Jr., Davidson, N.E., Tan-Chiu, E., Martino, S., Paik, S., Kaufman, P.A., *et al.* (2005). Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 353, 1673-1684.
- Ryu, M.H., Kang, Y.K., Jang, S.J., Kim, T.W., Lee, H., Kim, J.S., Park, Y.H., Lee, S.S., Ryoo, B.Y., Chang, H.M., *et al.* (2007). Prognostic significance of p53 gene mutations and protein overexpression in localized gastrointestinal stromal tumours. *Histopathology* 51, 379-389.
- Sanchez, G., Bittencourt, D., Laud, K., Barbier, J., Delattre, O., Auboeuf, D., and Dutertre, M. (2008). Alteration of cyclin D1 transcript elongation by a mutated transcription factor up-regulates the oncogenic D1b splice isoform in cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 6004-6009.
- Sand, L.G., Suzhai, K., and Hogendoorn, P.C. (2015). Sequencing Overview of Ewing Sarcoma: A Journey across Genomic, Epigenomic and Transcriptomic Landscapes. *Int J Mol Sci* 16, 16176-16215.
- Sankar, S., and Lessnick, S.L. (2011). Promiscuous partnerships in Ewing's sarcoma. *Cancer Genet* 204, 351-365.
- Scannell, C.A., Pedersen, E.A., Mosher, J.T., Krook, M.A., Nicholls, L.A., Wilky, B.A., Loeb, D.M., and Lawlor, E.R. (2013). LGR5 is Expressed by Ewing Sarcoma and Potentiates Wnt/beta-Catenin Signaling. *Front Oncol* 3, 81.
- Schleiermacher, G., Peter, M., Oberlin, O., Philip, T., Rubie, H., Mechinaud, F., Sommelet-Olive, D., Landman-Parker, J., Bours, D., Michon, J., *et al.* (2003). Increased risk of systemic relapses associated with bone marrow micrometastasis and circulating tumor cells in localized ewing tumor. *J Clin Oncol* 21, 85-91.
- Shukla, N., Schiffman, J., Reed, D., Davis, I.J., Womer, R.B., Lessnick, S.L., Lawlor, E.R., and Committee, C.O.G.E.S.B. (2013). Biomarkers in Ewing Sarcoma: The Promise and Challenge of Personalized Medicine. A Report from the Children's Oncology Group. *Front Oncol* 3, 141.
- Simon, R.M., Paik, S., and Hayes, D.F. (2009). Use of archived specimens in evaluation of prognostic and predictive biomarkers. *J Natl Cancer Inst* 101, 1446-1452.
- Sjoblom, T., Jones, S., Wood, L.D., Parsons, D.W., Lin, J., Barber, T.D., Mandelker, D., Leary, R.J., Ptak, J., Silliman, N., *et al.* (2006). The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* 314, 268-274.
- Solomon, D.A., Wang, Y., Fox, S.R., Lambeck, T.C., Giesting, S., Lan, Z., Senderowicz, A.M., Conti, C.J., and Knudsen, E.S. (2003). Cyclin D1 splice variants. Differential effects on localization, RB phosphorylation, and cellular transformation. *J Biol Chem* 278, 30339-30347.

- Sorenson, G.D., Pribish, D.M., Valone, F.H., Memoli, V.A., Bzik, D.J., and Yao, S.L. (1994). Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 3, 67-71.
- Specht, K., Sung, Y.S., Zhang, L., Richter, G.H., Fletcher, C.D., and Antonescu, C.R. (2014). Distinct transcriptional signature and immunoprofile of CIC-DUX4 fusion-positive round cell tumors compared to EWSR1-rearranged Ewing sarcomas: further evidence toward distinct pathologic entities. *Genes Chromosomes Cancer* 53, 622-633.
- Strizzi, L., Muraro, R., Vianale, G., Natoli, C., Talone, L., Catalano, A., Mutti, L., Tassi, G., and Procopio, A. (2002). Expression of glycoprotein 90K in human malignant pleural mesothelioma: correlation with patient survival. *J Pathol* 197, 218-223.
- Struewing, J.P., Hartge, P., Wacholder, S., Baker, S.M., Berlin, M., McAdams, M., Timmerman, M.M., Brody, L.C., and Tucker, M.A. (1997). The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. *N Engl J Med* 336, 1401-1408.
- Sumegi, J., Nishio, J., Nelson, M., Frayer, R.W., Perry, D., and Bridge, J.A. (2011). A novel t(4;22)(q31;q12) produces an EWSR1-SMARCA5 fusion in extraskeletal Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumor. *Mod Pathol* 24, 333-342.
- Sun, H., Lin, D.C., Cao, Q., Pang, B., Gae, D.D., Lee, V.K.M., Lim, H.J., Doan, N., Said, J.W., Gery, S., *et al.* (2017). Identification of a Novel SYK/c-MYC/MALAT1 Signaling Pathway and Its Potential Therapeutic Value in Ewing Sarcoma. *Clin Cancer Res* 23, 4376-4387.
- Suzhai, K., Ijszenga, M., de Jong, D., Karseladze, A., Tanke, H.J., and Hogendoorn, P.C. (2009). The NFATc2 gene is involved in a novel cloned translocation in a Ewing sarcoma variant that couples its function in immunology to oncology. *Clin Cancer Res* 15, 2259-2268.
- Thorlacius, S., Struewing, J.P., Hartge, P., Olafsdottir, G.H., Sigvaldason, H., Tryggvadottir, L., Wacholder, S., Tulinius, H., and Eyfjord, J.E. (1998). Population-based study of risk of breast cancer in carriers of BRCA2 mutation. *Lancet* 352, 1337-1339.
- Tie, J., Wang, Y., Tomasetti, C., Li, L., Springer, S., Kinde, I., Silliman, N., Tacey, M., Wong, H.L., Christie, M., *et al.* (2016). Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci Transl Med* 8, 346ra392.
- Tinari, N., Kuwabara, I., Huflejt, M.E., Shen, P.F., Iacobelli, S., and Liu, F.T. (2001). Glycoprotein 90K/MAC-2BP interacts with galectin-1 and mediates galectin-1-induced cell aggregation. *Int J Cancer* 91, 167-172.
- Tinari, N., Lattanzio, R., Querzoli, P., Natoli, C., Grassadonia, A., Alberti, S., Hubalek, M., Reimer, D., Nenci, I., Bruzzi, P., *et al.* (2009). High expression of 90K (Mac-2 BP) is associated with poor survival in node-negative breast cancer patients not receiving adjuvant systemic therapies. *Int J Cancer* 124, 333-338.
- Tirado, O.M., Mateo-Lozano, S., Villar, J., Dettin, L.E., Llort, A., Gallego, S., Ban, J., Kovar, H., and Notario, V. (2006). Caveolin-1 (CAV1) is a target of EWS/FLI-1 and a key determinant of the oncogenic phenotype and tumorigenicity of Ewing's sarcoma cells. *Cancer Res* 66, 9937-9947.
- Tirode, F., Surdez, D., Ma, X., Parker, M., Le Deley, M.C., Bahrami, A., Zhang, Z., Lapouble, E., Grossetete-Lalami, S., Rusch, M., *et al.* (2014). Genomic landscape of Ewing sarcoma defines an aggressive subtype with co-association of STAG2 and TP53 mutations. *Cancer Discov* 4, 1342-1353.
- Torchia, E.C., Boyd, K., Rehg, J.E., Qu, C., and Baker, S.J. (2007). EWS/FLI-1 induces rapid onset of myeloid/erythroid leukemia in mice. *Mol Cell Biol* 27, 7918-7934.
- Uren, A., Wolf, V., Sun, Y.F., Azari, A., Rubin, J.S., and Toretsky, J.A. (2004). Wnt/Frizzled signaling in Ewing sarcoma. *Pediatr Blood Cancer* 43, 243-249.
- van Doorninck, J.A., Ji, L., Schaub, B., Shimada, H., Wing, M.R., Krailo, M.D., Lessnick, S.L., Marina, N., Triche, T.J., Sposto, R., *et al.* (2010). Current treatment protocols have eliminated the prognostic advantage of type 1 fusions in Ewing sarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* 28, 1989-1994.

Wan, J.C.M., Massie, C., Garcia-Corbacho, J., Mouliere, F., Brenton, J.D., Caldas, C., Pacey, S., Baird, R., and Rosenfeld, N. (2017). Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer* 17, 223-238.

Wang, L., Bhargava, R., Zheng, T., Wexler, L., Collins, M.H., Roulston, D., and Ladanyi, M. (2007). Undifferentiated small round cell sarcomas with rare EWS gene fusions: identification of a novel EWS-SP3 fusion and of additional cases with the EWS-ETV1 and EWS-FEV fusions. *J Mol Diagn* 9, 498-509.

Wei, G., Antonescu, C.R., de Alava, E., Leung, D., Huvos, A.G., Meyers, P.A., Healey, J.H., and Ladanyi, M. (2000). Prognostic impact of INK4A deletion in Ewing sarcoma. *Cancer* 89, 793-799.

Yamaguchi, S., Yamazaki, Y., Ishikawa, Y., Kawaguchi, N., Mukai, H., and Nakamura, T. (2005). EWSR1 is fused to POU5F1 in a bone tumor with translocation t(6;22)(p21;q12). *Genes Chromosomes Cancer* 43, 217-222.

Zambelli, D., Zuntini, M., Nardi, F., Manara, M.C., Serra, M., Landuzzi, L., Lollini, P.L., Ferrari, S., Alberghini, M., Llombart-Bosch, A., *et al.* (2010). Biological indicators of prognosis in Ewing's sarcoma: an emerging role for lectin galactoside-binding soluble 3 binding protein (LGALS3BP). *Int J Cancer* 126, 41-52.

Zhao, L., Han, T., Li, Y., Sun, J., Zhang, S., Liu, Y., Shan, B., Zheng, D., and Shi, J. (2017). The lncRNA SNHG5/miR-32 axis regulates gastric cancer cell proliferation and migration by targeting KLF4. *FASEB J* 31, 893-903.

Zoubek, A., Ladenstein, R., Windhager, R., Amann, G., Fischmeister, G., Kager, L., Jugovic, D., Ambros, P.F., Gadner, H., and Kovar, H. (1998). Predictive potential of testing for bone marrow involvement in Ewing tumor patients by RT-PCR: a preliminary evaluation. *Int J Cancer* 79, 56-60.

Zucman, J., Melot, T., Desmaze, C., Ghysdael, J., Plougastel, B., Peter, M., Zucker, J.M., Triche, T.J., Sheer, D., Turc-Carel, C., *et al.* (1993). Combinatorial generation of variable fusion proteins in the Ewing family of tumours. *EMBO J* 12, 4481-4487.

RINGRAZIAMENTI

I miei ringraziamenti vanno prima di tutto ai miei Supervisor, Prof.ssa Cinzia Zucchini, per l'infinita pazienza e disponibilità con cui mi ha seguita durante questo percorso, e Prof.ssa Katia Scotlandi, senza il cui prezioso supporto scientifico questo lavoro non sarebbe stato possibile.

Desidero inoltre ringraziare colleghi ed amici che mi hanno accompagnata in questi anni: Simona e Camilla, per il tempo passato insieme dentro e fuori dal laboratorio, se Bologna è nel mio cuore è anche per merito vostro; Alessandro e Valentina, inseparabili compagni 'della Biol.Mol', che si sono imbattuti più volte nella versione sotto-stress di me stessa, sopportandola molto meglio di quanto l'abbia sopportata io; e Clara, grazie per avermi insegnato tanto e con tanta pazienza, sei un ricercatore da cui c'è e ci sarà sempre tanto da imparare.

Infine il mio pensiero va al versante Ferrarese della mia vita: alle mie migliori amiche Chiara e Camilla, su cui ho potuto contare in qualsiasi momento, e alla mia famiglia, il cui sostegno (da vicino e da lontano) è una certezza che mi accompagna ogni giorno: grazie.